

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin

Leiter: Professor Dr. med. W. Schwarz

**Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die
Entwicklung der quergestreiften Muskulatur im
Gesichtsbereich von Rattenembryonen**

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich, Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Bärbel Barz geb. Boysen
aus Berlin

1973

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin

Leiter: Professor Dr. med. W. Schwarz

**Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die
Entwicklung der quergestreiften Muskulatur im
Gesichtsbereich von Rattenembryonen**

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich, Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Bärbel Barz geb. Boysen

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Merker

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Hans Lenz

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und
Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 6.11.1973

" Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung der quergestreiften Muskulatur im Gesichtsbereich von Rattenembryonen. "

EINLEITUNG

Die Morphogenese eines Organismus vollzieht sich in einer Folge vieler Einzelschritte. Bei ihrer Durchführung und Realisation spielen zahlreiche Mechanismen eine Rolle. Kompliziert werden diese Vorgänge noch durch ihre gegenseitige Beeinflussung und das Entstehen neuer morphologischer Strukturen und Substrate (BRACHET, 1961; NEEDHAM, 1950; SPEMANN, 1936; HAMILTON et al., 1972; STARCK, 1965). Als wesentliche formbildende Kraft bei der embryologischen Ontogenese muß die mitotische Aktivität und damit der Proliferationsdruck betrachtet werden. Daneben sind aber in letzter Zeit sowohl die Verschiebung von Gewebematerial über größere Strecken (BLECHSCHMIDT, 1963, 1968) und damit zusammenhängend die Zellwanderung bzw. Kontraktilität des Cytoplasmas, als auch die Kontraktion der relativ früh differenzierten Muskulatur diskutiert worden (GONZALES, 1952; HUMPHREY, 1968, 1969; WALKER, 1969; SCHWEICHEL, 1973). Gerade im Kopfbereich scheint die Muskulatur als morphogenetische Kraft eine große Bedeutung zu haben (Siehe auch BRECHLER, 1971). Hier sind es besonders zwei Stellen, an deren Entwicklung die Muskulatur beteiligt ist: 1. die Bildung des definitiven Gaumens und 2. die Formung des Unterkiefers (Lit. siehe CREDNER, 1972). Die Bedeutung des motorischen Apparates für die Gaumenbildung kann etwa folgendermaßen umrissen werden (BURDI et al., 1972; DRILLIEN et al., 1966; FRASER, 1971; FRASER et al., 1957; HUMPHREY, 1969; WALKER, 1969): Nach einer extremen Lordose-Stellung in den sehr frühen Phasen (bei der Ratte bis etwa Tag 9) kommt es zu einer extremen Ventralflexion, d.h. das Kinn und Teile des Gesichtes liegen der Brust und der zu dieser Zeit mächtig vorgewölbten Herzanlage auf. Die Möglichkeit einer Mundöffnung, Mund- und Zungenbewegung besteht also in dieser Stellung nicht. Bei Betrachtung eines histologischen Frontalschnittes durch den Kopf eines Embryos vor dem Gaumenschluss (Tag 15) wird aber deutlich, daß die Zunge sehr fest zwischen den beiden herabhängenden Gaumenfortsätzen eingepast ist (NEUNER, 1969; LEIMEISTER, 1970; BLUNK, 1970). Eine Elevation dieser Fortsätze

und damit der Gaumenschluß ist deshalb nur dann möglich, wenn die Zunge aus diesem Bereich entfernt wird. In der Literatur ist dieser Vorgang und die Lösung dieses Problems noch umstritten (Lit. siehe BURDI et al., 1972). Ist das muskuläre System beteiligt, muß die Beteiligung von drei Muskelgruppen diskutiert werden:

1. Die dorsale Rückenmuskulatur. Sie bewirkt die Aufhebung der ausgeprägten Ventralflexion und die Streckung bzw. Lordose des Rückens und Nackens. Dadurch wird der Unterkiefer von der Brust frei und kann jetzt bewegt werden (WALKER, 1969).
2. Die Kau- und Gesichtsmuskulatur. Sie ist in der Lage, den Unterkiefer zu bewegen und den Mundraum zu verändern (HUMPHREY, 1969).
3. Die Zungenmuskulatur. Durch ihre Aktivität wird die Zunge verformt und kann sich jetzt in dem durch die oben beschriebenen Muskelgruppen geschaffenen Raum, und nach außen, bewegen (SCHWEICHEL und SEINSCH, 1973). Zweifellos könnte auf diese Weise die Zunge den Raum zwischen den herabhängenden Gaumenfalten verlassen und so den Platz für die Aufrichtung der Falten freigeben.

Darüber hinaus würde eine motorische Aktivität dieser Muskeln vielleicht auch noch andere positive Wirkungen auf die Gaumenbildung haben. Es wäre denkbar, daß Zungen- und Mundbewegungen die Gaumenfalten hochschieben oder, daß einströmendes Fruchtwasser dabei eine Rolle spielt (FRASER et al., 1967; TRASLER et al., 1956). Die Vorstellungen finden sich in der Literatur bereits besprochen. Für alle diese Vorgänge - wobei an dieser Stelle die multifaktorielle Bedingtheit des Gaumenschlusses auch durch nicht - muskuläre Faktoren betont werden soll - ist aber ein funktionsfähiges und bereits differenziertes motorisches System Voraussetzung. Nur dann ist es sinnvoll, die Beteiligung der Muskulatur an der Bildung des definitiven Gaumens zu vermuten. Einige Publikationen scheinen die Berechtigung dieser Vermutung zu bestätigen. Die cinematographische Erfassung der Bewegungen des Embryos bzw. Foeten (Ratte) in der Amnionflüssigkeit machen ein Einsetzen motorischer Aktivität (Mund-, Unterkiefer- und Zungenbewegungen, Dorsalflexionen der Wirbelsäule) etwa am Tag 16 (Gaumenschluß bei der Ratte am späten Tag 16) wahrscheinlich (WALKER, 1969; MERKER, 1973).

Der Versuch, durch Ausschalten der motorischen Aktivität eine Störung des Gaumenschlusses zu erreichen, führte nicht zu einheitlichen Ergebnissen (JACOBS, 1971).

Das scheint nicht überraschend, da von diesen Substanzen die Placentagängigkeit, der Stoffwechsel in Mutter und Keim, die Verteilung in den verschiedenen Kompartments (Mutter-Placenta-Keim) usw. noch längst nicht sicher bekannt sind.

Morphologische, besonders elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Problem der Reifung des motorischen Systems im Gesichtsbereich sind unseres Wissens bisher nur von (SCHWEICHEL und SEINSCH, 1973) an der Zungenmuskulatur der Ratte durchgeführt worden. Diese Autoren kommen zu dem Schluß, daß die Reifung der Zungenmuskulatur am Tag 16 zwar soweit fortgeschritten ist, daß eine gerichtete und synchrone Aktivität und damit eine Beteiligung an den oben erwähnten Vorgängen des Gaumenschlusses vermutet werden könnte. Aus verschiedenen anderen Gründen betrachten sie aber diese Schlußfolgerung sehr skeptisch. - Über die Morphologie der Reifung und Differenzierung anderer Muskelsysteme auch an anderen Species liegen bereits eine Fülle von Untersuchungen vor (HAY, 1963; DESSOUKY and NIBBS, 1965; PRZYBILSKI and BLUMBERG, 1966; KELLY and ZACKS, 1969).

Zuletzt hat SCHÜSSLER, (1971/1973) aus diesem Institut auf Grund der elektronenmikroskopischen Studien über die Muskelentwicklung des Hühnchens zusammenfassend über diese Probleme berichtet. Auf diese Untersuchungen kann also als Vergleichsgrundlage verwiesen werden. Aus ihnen geht hervor, daß bereits ein sehr umfassendes morphologisches Bild der Muskelentwicklung zur Verfügung steht. Allerdings gibt es auch dabei noch Lücken oder umstrittene Probleme, auf die bei einer elektronenmikroskopischen Darstellung der embryonalen Muskelentwicklung eingegangen werden sollte. Nachdem das Problem der vielkernigen Muskelfaserentwicklung durch ein Zusammenfluß einzelner, einkerniger Myoblasten erklärt werden konnte (COLEMAN and COLEMAN, 1968; BISHOFF and HOLTZER, 1969; SHIMADA, 1971) blieben besonders die Ursachen und Mechanismen, die die Ausrichtung der Myofilamente und ihre Ordnung zu Myofibrillen in der Zelle übernehmen noch umstritten (RASH et al., 1970;

BISHOFF and HOLTZER, 1968, WARREN, 1969; SCHÜSSLER, 1973). Auch die Reifung der Strukturen in der Zelle, die die Weiterleitung der Erregung zu den Myofibrillen übernehmen, also das T- und das sarcoplasmatische L-System sind in ihrem morphologischen und zeitlichen Verhalten noch nicht sicher abgeklärt (BRAND et al., 1965, EZERMAN and ISHIKAWA, 1967; ISHIKAWA, 1968).

In dieser Arbeit soll deshalb an Embryonen bzw. Foeten von Ratten die Frage beantwortet werden, ob aufgrund des elektronenmikroskopischen, lichtmikroskopischen und histochemischen Bildes und des damit beurteilbaren Reifungsgrades die immer wieder vermutete Beteiligung des muskulären Systems am Gaumenschluß diskutiert werden kann. Nur wenn die Muskelfasern reif sind, d.h. vollgeordnete Myofibrillen enthalten, das Nervensystem und myoneurale Verbindungen vorhanden sind und schließlich das Bindegewebe zur Kraftübertragung kräftig genug ist, wäre eine derartige Beteiligung an morphogenetischen Vorgängen möglich. Darüber hinaus soll auf einige noch unklare Probleme der allgemeinen Muskeldifferenzierung eingegangen werden.

MATERIAL und METHODEN

Das verwendete Tiermaterial stammt von einem Wistar-Stamm (PADERBORN). Zunächst wurden Serien des Unterstammes FW 68, dann solche vom Unterstamm FW 69 bearbeitet. Um das Material zu vereinheitlichen, gehören jedoch alle in dieser Arbeit ausgewerteten Tiere zum Unterstamm FW 69. Zur exakten Definierung des Alters der Rattenembryonen bzw. Foeten, hat sich die Verwendung eines verschobenen Tag- Nachtrythmus bewährt. Unter dem gewählten Hell- Dunkelrythmus (12 - 12 Stunden) paaren sich die Tiere zwischen 7.30 und 9.30 Uhr. Da bereits gegen 8.00 Uhr 80% der Tiere spermienpositiv sind, wird dieser Zeitpunkt als Schwangerschaftsbeginn willkürlich festgelegt. Die folgenden 24 Std. können dementsprechend als Tag 0 und die Zwischenzeiten als Stundenzahl seit 8.00 Uhr bezeichnet werden. Für diese Untersuchung verwenden wir Embryonen bzw. Foeten von Tag 11 bis zur Geburt Tag 21. Die Entnahme erfolgte meistens vormittags (11.00 - 12.00 Uhr). In den Tagen 14 - 17 jedoch auch zusätzlich abends (17.00 - 18.00 Uhr). Zur Entnahme der Embryonen wurden die Muttertiere nach Aethernarkose decapitiert und die Embryonen nach Eröffnung der Bauchhöhle sofort ohne Eihäute und Placenta in die Fixierlösung eingebracht. Die Fixierung erfolgte bis zum Tag 13 in toto. Den älteren Embryonen wurden die benötigten Teile durch Zerstücklung gezielt entnommen. Die Fixierungslösung bestand aus einem modifizierten Karnovsky-Gemisch: 3% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer. Nach Waschen der Pufferlösung erfolgte die Nachfixierung in einer 1%igen gepufferten Os O4-Lösung. Nach Entwässerung in der Acetonreihe, betteten wir in Micropal ein (Fa. FERAK, BERLIN). Die Schnitte wurden an Reichert-LKB-Mikrotomen hergestellt und anschließend mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert. Die Betrachtung und die Herstellung der Aufnahmen erfolgten in Siemens-Elmiskopen von Typ I, Ia und IOI. Zur Suche der geeigneten Stellen und zur besseren Orientierung im Dünnschnitt, wurden Semidickschnitte hergestellt (1/4) und mit alkalischer Giesma-Lösung bei 60° C für 1 Minute gefärbt. Diese Schnitte lassen sich leicht lichtmikroskopisch beurteilen. Für die normale lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Embryonen in toto in Bouin'scher

Lösung fixiert (nicht länger als 48 Std.), in Paraplast eingebettet und gefärbt. (H.-E., Van Gieson, PAS). Zur Darstellung der motorischen Endplatten verwendeten wir die Nachweismethode für Cholin-esterase nach Koelle-Friedenwald (Thompson 1966).

BEFUNDE

Lichtmikroskopie: Bei Rattenembryonen des Tages 12 ist im Gesichtsbereich die Verschmelzung der verschiedenen Gesichtsfortsätze abgeschlossen. Die Zungenanlage ist als flacher Höcker deutlich sichtbar, die Gaumenfalten beginnen sich gerade zu entwickeln. Das erste, morphologisch sicher faßbare Blastem ist das Ursprungsgewebe des Meckel'schen Knorpel im Bereich des Unterkiefers. Andere Blasteme sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht sicher nachzuweisen. Am Ende des Tages 12 beginnt sich dann allerdings das sonst noch sehr lockere Mesenchym im Bereich der Zunge zu verdichten. Als Blastem verstehen wir einen dicht gepackten Verband aus plumpen Zellen, die sich durch das Fehlen längerer und unregelmäßiger Fortsätze von typischen Mesenchymzellen unterscheiden und die die prospektive Fähigkeit haben, sie zu Muskelgewebe und Skelett zu differenzieren. Am Tag 13 treten dann sowohl im Mundbereich (Wange und Zunge) als auch im Halsbereich typische Muskelblasteme auf. Dabei runden sich die sonst mehrzipfelförmigen, polygonalen oder bipolaren Mesenchymzellen ab, und ihre Packungsdichte nimmt in umschriebenen Arealen deutlich zu, d.h. die Interzellularräume verschwinden.

Es ist mit den üblichen lichtmikroskopischen Mitteln nicht sicher zu entscheiden, ob die Verdickung durch eine Zellwanderung mitbedingt ist. Sicher aber lassen sich in diesen Gebieten viele Mitosen nachweisen, so daß eine mitotische Zellvermehrung bei der Blastembildung eine Rolle spielen muß. Die jetzt dicht gepackten, runden Zellen (Myoblasten) bekommen untereinander einen direkten Kontakt, wodurch die Zellgrenzen lichtmikroskopisch nicht mehr sicher erkennbar sind. Am Tag 15 treten die ersten Muskelfasern (Myotuben) aus 3 - 5 zusammengefloßenen Myoblasten auf. Vom späten Tag 15 ab lassen sich auch schon lichtmikroskopisch in diesen Muskelfasern die ersten feinen Myofibrillen in der Peripherie der Muskelfasern nachweisen. Am Ende des Tages 15, besonders aber am Tag 16, kommt bei hohen Vergrößerungen eine zarte Querstreifung zum Vorschein. Gleichzeitig nimmt die Zahl der verschmolzenen Myoblasten, d.h. die Länge der Muskelfasern zu. Jetzt sind auch schon deutlich der Faserverlauf und die einzelnen Muskelfaserindividuen zu erkennen.

Da der cytologische und zeitliche Ablauf der Histiogenese der verschiedenen Muskeln im Gesichtsbereich und die zytologische Differenzierung ihrer Muskelfaser keine Unterschiede aufweisen, sollen im Verlauf der Befunderhebung keine Unterschiede zwischen den einzelnen Muskeln gemacht und die Muskulatur in ihrer Gesamtheit besprochen werden.

Am Tag 16 hebt sich die Verlaufsrichtung der Muskelfasern in den einzelnen Muskelindividuen deutlich hervor. Das Zytoplasma einzelner Muskelfasern ist bereits fast vollständig ausgefüllt mit Myofibrillen, jedoch liegen die Kerne noch überwiegend zentral. Daneben kommen aber immer noch einzelne plumpe Myoblasten vor, die entweder einen engen räumlichen Kontakt zu Muskelfasern haben oder isoliert im Muskelbereich liegen. Die Muskelfasern beginnen sich zu gruppieren, zwischen den einzelnen Gruppen, d.h. in den späteren Septen, lassen sich einzelne vorwiegend bipolare Fibroblasten identifizieren.

Parallel zur Entwicklung der Muskulatur läuft die Entstehung des Kopfskelettes ab. Der Meckel'sche Knorpel ist bereits am Ende des Tages 12 ausgebildet und ab späten Tag 15 finden sich in seiner unmittelbaren Nähe die ersten Zeichen der desmalen Ossifikation für den Unterkieferknochen. Am Ende des Tages 13 sind alle übrigen hier interessierenden Skeletteile knorpelig angelegt und als isolierte Knorpelstücke lichtmikroskopisch deutlich zu erkennen. Die chondrale oder desmale Ossifikation beginnt frühestens am späten Tag 16 - die desmale Verknöcherung der Mandibula ist also das erste Zeichen der Mineralisation.

Elektronenmikroskopie: Nach dem Zusammenfließen der verschiedenen Gesichtsfortsätze, besteht das Mesenchym im Mundbereich aus einem unterschiedlich lockeren Zellverband. Die sehr polymorphen Zellen können bipolar, mehrzipfelig, polygonal oder auch abgerundet sein. Sie besitzen eine Fülle unterschiedlich langer und dicker Fortsätze. Sie strahlen in die Umgebung aus, verzweigen sich hier teilweise, enden blind oder bekommen Kontakt mit entsprechenden Fortsätzender Nachbarzellen. An den Berührungsstellen bilden sich jedoch keine spezialisierten Kontaktzonen aus. Man findet vorwiegend einen Interzellularspalt von etwa $200 \text{ \AA}$ und nur selten eine Verschmälerung auf $50 \text{ \AA}$ (close contact). Die Mesenchymzellen

enthalten einen großen, vorwiegend runden Kern mit aufgelockertem Karyoplasma und einem großen, deutlich abgrenzbaren Nucleolus, der aus bandförmigen Verdichtungen, den sogenannten Nucleonemata, dazwischen liegenden Aufhellungen (Nucleolusvakuolen), unterschiedlich dicht gepackten granulären Elementen und einer diffusen, weniger elektronendichten Matrix besteht. Im Zytoplasma überwiegen freie Ribosomen, die in Form von Polysomen gruppiert sind. Daneben lassen sich noch einzelne kleine Mitochondrien mit wenig Matrix und eine geringe Zahl unregelmäßig verlaufender Mitochondrien beobachten. Vereinzelt aber sind immer wieder Zellen darzustellen, die langgestreckte christaereiche Mitochondrien enthalten. Einzelne kurze Hohlräume des rauen endoplasmatischen Retikulums, kleine Vesikel und Granula kommen darüber hinaus vor. Die plumpovalen Zellen des Muskelblastems besitzen dagegen keine oder nur wenige Fortsätze. Sind Fortsätze vorhanden, so entsprechen sie kleinen Mikrovilli (Durchmesser bis zu $0,5\mu$ - Länge bis zu 1μ), oder plumpen Protrusionen. Im Zytoplasma überwiegen, wie in den eben beschriebenen Mesenchymzellen, die freien Polysomen. Auch das übrige Bild des Zytoplasma und des Kernes entspricht diesem embryonalen Zelltyp.

Auffällig ist aber das Kontaktverhalten dieser abgerundeten Zellen, die im Folgenden als Myoblasten bezeichnet werden. Während die Mesenchymzellen nur ganz selten kurze Kontaktstellen aufweisen, verlaufen die Membranen benachbarter Myoblasten auf langen Strecken parallel zueinander. Durch die leichte Umdulierung der Membranen wechselt die Breite des Interzellularspaltes. An den weitesten Stellen lassen sich Werte von $300 \text{ \AA}$, an den engsten Stellen solche von $50 \text{ \AA}$ messen. Daneben gibt es aber noch Bilder, auf denen die Darstellung der Zellmembranen nicht sicher gelingt. Zweifellos wird dieses Verhalten durch die Schnittrichtung bestimmt, d.h. bei schrägem Anschnitt kommt es zu einer Überlappung und damit Übereinanderprojektion der Membranen. Die Häufigkeit derartiger Befunde und der exakte Nachweis aller Membranen in der Nachbarschaft, lassen aber auch noch eine Deutung zu. Die Entstehung der Muskelfaser durch den Zusammenfluß der Myoblasten ist inzwischen eindeutig nachgewiesen. Die schlechte Darstellbarkeit der Zellmembranen im Kontaktbereich könnte also auch für eine Auflösung der Membrane an diesen Stellen sprechen.

Kurz nach dem Zusammenfluß der Myoblasten zu Muskelfasern, beginnen im Zytoplasma dieser Zellen die ersten filamentären Strukturen aufzutreten. Es lassen sich drei Filamentarten unterscheiden. Bei der Durchmusterung der Präparate ist es sehr schwierig zu entscheiden, ob eine zeitliche Sequenz in ihrem Auftreten vorhanden ist. In den meisten Bildern kommen alle drei Filamenttypen gemeinsam vor. Nur in wenigen Aufnahmen ist der erste Filamenttyp allein darzustellen. Es handelt sich um etwa 100 Å dicke Filamente, die im gesamten Zytoplasmabereich einiger Zellen einzeln und völlig regellos verlaufend vorkommen. Der zweite und dritte Filamenttyp entspricht typischen Aktin- und Myosinfilamenten mit einer Dicke von 60 Å bzw. 120 - 150 Å. Die letzten beiden Filamentarten lassen sich niemals einzeln nachweisen. Sie kommen von vornherein in paralleler Verlaufsrichtung, entsprechend der Längsachse der Muskelfasern, gebündelt vor. Dabei scheint ein Filamentbündel, d.h. eine Myofibrille, endständig zu wachsen. Natürlich ist es schwierig wegen der geringen Schnittdicke, Aussagen über das Längswachstum zu machen. In frühen Stadien der Muskeldifferenzierung überwiegen aber kurze Abschnitte aus 2 - 5 Sarkomeren trotz Anschnitt in Längsachse der Zelle. Die Enden der wachsenden Myofibrille zeigen darüber hinaus auch qualitative Unterschiede, die eine Unterscheidung gegenüber Schrägschnitten durch längere Myofibrillen ermöglichen. Die Packungsdichte sowohl der Actin- als auch der Myosinibrillen ist hier sehr viel lockerer, und einzelne Filamente ragen isoliert in die Umgebung vor. Ein weiterer Hinweis für ein Aufwachsen der Myofibrillen an diesen Stellen, stellen die Ribosomen dar. Während sie noch bei den Myoblasten alle Teile des Zytoplasmas relativ dicht gepackt ausfüllen, nimmt die Zahl in den Myotuben deutlich ab. Nur im Bereich der wachsenden Myofibrillen und hier besonders in den soeben beschriebenen Endabschnitten, kommen sie in größeren Mengen vor. Sie sind ebenso, wie in den früheren Stadien, fast ausschließlich in Form von Polysomen angeordnet, also als Gruppe, Reihe oder Rosette. In den Endabschnitten der Myofibrillen findet sich darüber hinaus noch eine andere Anordnung der Ribosomen. Im Schnitt sind sie hier in zwei Reihen parallel auf Lücke gelagert. Nach sterischer Analyse dieser Strukturen muß angenommen

werden, daß es sich um eine schraubig verlaufende Ribosomenkette handelt, deren Längsachse parallel zu den Myofilamenten verläuft. Da die Funktion der Ribosomen die Proteinsynthese ist, kann vermutet werden, daß an diesem Schraubenpolysomen die Myofilamente gebildet werden. Mit den beiden Myofilamentarten (Actin und Myosin) treffen auch gleichzeitig die Z-Streifen auf. Offenbar muß eine synchrone Bildung der verschiedenen Bestandteile einer Myofibrille postuliert werden. Auffällig ist die Lokalisation der ersten Myofilamentbündel. Sie finden sich vorwiegend in der Peripherie der Muskelfaser. Das Zentrum der Muskelfaser ist relativ organellenarm, besonders arm an Ribosomen und deshalb wenig elektronendicht. Wir finden hier langgestreckte Mitochondrien vom Christaetyp, einzelne kurze Hohlräume des rauen endoplasmatischen Retikulums, einzelne Vesikel, kleine Granula und einzelne Polysomen, sowie die oben beschriebenen Filamente vom Typ I. Die Kerne selbst liegen noch vorwiegend zentral, sind aber bereits langgestreckt oval und zeigen einige Einkerbungen. Das Karyoplasma ist locker verteilt und der typisch embryonale Nukleolus eher groß.

Muskelfasern mit Myofibrillenbündeln in der Peripherie lassen sich bereits am Tag 15 bei den Rattenembryonen nachweisen. Daneben kommen aber zu diesem Zeitpunkt noch zahlreiche Myoblasten vor und Myoblasten die zu Fasern zusammenfließen, oder gerade zusammengefloßen sind, d.h. noch keine Fibrillen enthalten. Die Differenzierung geht also nicht gleichmäßig vor sich, sondern die Myoblasten teilen sich laufend noch weiter, und es entstehen daraus auch noch laufend durch Zusammenfluß Muskelfasern. Diese Variabilität im Reifungsgrad erschwert natürlich die Beurteilung, es gelingt allerdings durch Vergleich der jeweils reifsten Stadien, die Entwicklung zu erfassen und zu definieren. Ebenfalls am Tag 15 läßt sich ein weiterer Zelltyp beobachten. Es handelt sich um angedeutet bipolare Zellen, die ein oder zwei lange, plattenförmige Fortsätze aussenden. Der Kern zeigt Chromatinverdichtungen. Im Zytoplasma überwiegen Hohlräume des rauen endoplasmatischen Retikulums. In Analogie zu aktiven Mesenchymzellen in anderen Bezirken, können diese Zellen als Fibroblasten bezeichnet werden. Sie produzieren die Interzellulärschubsubstanz.

die für die Muskelscheiden, das Bindegewebe im Muskel und die Sehnen benötigt werden. Die Bildung dieser Interzellularsubstanzen beginnt, entsprechend dem aktiven Aussehen der Fibroblasten, ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Morphologisch lassen sich diese Vorgänge erfassen durch das Auftreten feiner, etwa 100 - 150 Å dicker, isoliert und regellos verlaufender Filamente im extrazellulären Raum. Am späten Tag 15 lassen sich dann auch die ersten Fibrillen, d.h. kollagene Strukturen mit angedeuteter Querstreifung, darstellen. In den nächsten Tagen kommt es zu einer Verdickung der Fibrillen bis zu 350 Å, zu einer Vermehrung und zu einer Bündelung (5 - 10 Fibrillen), die lichtmikroskopisch als feine Fäserchen nachweisbar sind.

Am Tag 16 treten Muskelfasern auf, die auch im Zentrum schon Myofibrillen enthalten. Allerdings liegt der Kern noch nicht in seiner typischen peripheren Lage. Bei diesem Reifungsgrad beginnt auch die Bildung des charakteristisch sarkoplasmatischen Retikulums (L-System) und des T-Systems. Während vorher die Vesikulation an und unter der Zellmembran außerordentlich gering ist, treten jetzt zunehmend Vesikulationserscheinungen auf. Häufig liegen solche Bläschen in Gruppen, oder fließen sogar zu traubenförmigen Gebilden zusammen, die über ein Vesikel mit dem extrazellulären Raum in Verbindung stehen. Außerdem sind zunehmend Hohlräume des rauen endoplasmatischen Retikulums, die nicht oder nur stellenweise mit Ribosomen besetzt sind, dicht unter der Zellmembran lokalisiert. Die Zahl solcher Hohlräume hat auch in der Umgebung der Myofibrillen zugenommen. Eine deutliche Zuordnung zu bestimmten Teilen der muskulären Querstreifung ist aber noch nicht möglich. Erst mit dem Auftreten eines typischen T-Systems, d.h. fingerförmigen Einstülpungen bis ins Zentrum der Muskelfasern im Bereich des Z- oder I-Streifens bzw. der A - I Grenze, kommt es zu einer Ausrichtung des sarkoplasmatischen Retikulums. Morphologisch sicher nachweisbar ist dieses Verhalten erst am Tag 19. Zu diesem Zeitpunkt, besonders aber am Tag 20, lassen sich die ersten Triaden im I-Bereich nachweisen. Neben den jetzt schon reifen, myofibrillenreichen Muskelfasern kommen immer noch myoblastenähnliche undifferenzierte Zellen vor. Aus ihnen entstehen immer noch neue Muskelfasern. Einzelne lagern sich aber seitlich an bereits ausgereifte Muskelfasern an und buchten sich sogar etwas in deren Zytoplasma ein.

Später werden sie auch von einer Basalmembran umgeben. Es handelt sich um die Satellitenzellen. Da sie für unsere Fragestellung nicht wichtig sind, sollen sie nicht weiter beschrieben werden. SCHÜSSLER (1971/1973) ist auf dieses Problem genauer eingegangen. Einschließlich des Tages 13 lassen sich in den von uns untersuchten Muskelanlagen und auch in der Zunge keine Nervenfasern oder Axon-ähnliche Gebilde nachweisen. Einschränkend soll jedoch hier darauf hingewiesen werden, daß die Erkennung der ersten Axonspitzen außerordentlich schwierig sein kann. Noch ist nicht endgültig geklärt, ob die aus den Vorderhornzellen herauswachsenden Axone für eine gewisse Zeit nackt vorkommen, oder ob sie immer eine Schwann'sche Hülle besitzen. Kommen Axone nackt vor, ist ihre Unterscheidung von den häufig vorkommenden Mesenchymzellfortsätzen nur schwer möglich.

Erst im Laufe des Tages 14, lassen sich dann Axonbündel sicher darstellen. Sie sind fast kontinuierlich umgeben von flachen Schwann-Zellplatten, die aber noch nicht zwischen die Einzelaxone vordringen. Auf diesem Entwicklungsstadium besteht also ein Nerv aus einem Kabel dicht gepackter Axone mit einer einfachen äußeren Schwann-Zell-Scheide. Der Durchmesser der Axone schwankt zwischen $0,1 - 0,4 \mu$, d.h. die Schwankungsbreite der Axondicken ist verglichen mit erwachsenen Nerven, sehr viel geringer. Rein zytologisch unterscheidet sich das Zytoplasma beider Zellarten. Während sich die Schwannzelle durch eine große Zahl von freien Ribosomen auszeichnet, fehlen diese Strukturen fast völlig in den Axonen. Dafür sind Neurotubuli, Neurofilamente nachzuweisen. Im Verlaufe des späten Tages 14 und des frühen Tages 15, wird die Zahl der Axonbündelanschnitte größer. Offenbar wachsen die Axone weiter und spalten sich auf. Vereinzelt sind auch jetzt schon Einzelaxone zu beobachten.

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Entwicklung der Nerv-Muskelentwicklung ist sehr schwierig, da solche Stellen erfahrungsgemäß (persönliche Mitteilung MERKER, 1973) nur selten und nur vereinzelt im Schnitt getroffen werden und deshalb keine allgemeinen Aussagen möglich machen. Typische Endplatten lassen sich aber bis zum Tag 21, d.h. bis zur Geburt noch nicht sicher darstellen. Am späten Tag 16 oder am Tag 17 finden sich aber einzelne Axone,

die sich ohne besonderes strukturelles Verhalten an Muskelfasern anlegen. Der Abstand der Membranen dieser Zellen beträgt etwa 200 - 1000 Å. An diesen Stellen kommen gehäuft etwa 500 - 750 Å große Vesikel vor, die keinen elektronenmikroskopisch nachweisbaren Inhalt haben. Wegen dieser technischen Schwierigkeiten versuchten wir, die Entwicklung des Endplattensystems mit histochemischen Methoden zu verfolgen. Die Darstellung der Acetylcholinesterase hat sich dafür gut bewährt. Mit dieser Technik gelingt es am Tag 16 erste positive Plaques darzustellen. Am Tag 18 hat die Zahl dieser Strukturen zugenommen. Am Tag 21, besonders aber nach der Geburt, entstehen motorische Endplatten und ein dem reifen Zustand ähnliches Bild.

DISKUSSION

Bei der vorhergehenden Beschreibung der elektronenmikroskopischen Bilder wurde bewußt darauf verzichtet, zum Problem der Herkunft der Mesenchym- oder Blastemzellen Stellung zu nehmen. Mit dieser Methode erfaßt man statische Bilder, die keine Aussagen über ein Wanderungsverhalten, über die Richtung der Bewegung und eventuelle Herkunft der Zellen erlauben. Es ist deshalb wenig sinnvoll, auf Grund der elektronenmikroskopischen Befunde in diesen, teilweise noch umstrittenen Problembereich eingreifen zu wollen.

Sicher erfaßbar dagegen sind mit der elektronenmikroskopischen Technik die zytologischen Differenzierungsvorgänge. Die Entwicklung beginnt etwa am Tag 13 mit einem Zelltyp, der sich deutlich von den vorher in den entsprechenden Gebieten vorkommenden Mesenchymzellen durch seine plumpe Form unterscheidet, die sogenannten Myoblasten. In den nächsten Tagen fließen diese Einzelzellen zu vielkernigen Zellindividuen zusammen, den Muskelfasern. Gleichzeitig läuft die Synthese der Myofilamente ab, die sich sehr schnell zu typischen Myofibrillen in genauer, hexagonaler Packung, etagenartig und abgesichert durch Z-Streifen ordnen. Am späten Tag 16 sind zahlreiche Muskelfasern im Mund- und Zungenbereich bereits ausgefüllt mit solchen Myofibrillen, d.h. im zytologischen Sinne schon voll differenziert. In der Problemstellung dieser Arbeit wurde betont, daß nur die Kenntnis des genauen Zeitverlaufes der Reifung, Aussagen über morphologische Vorgänge im Gesichtsbereich und die Abschätzung der Beteiligung motorischer Aktivitäten erlaubt. Der Differenzierungsgrad der Muskulatur, ist dabei natürlich von großer Wichtigkeit. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen, daß dieser Faktor nicht limitierend sein kann. Der Gaumenschluß bei dem von uns verwendeten Rattenstamm geht am späten Tag 16 oder sogar erst am frühen Tag 17 vor sich (BRECHLER, 1970; BLUNK, 1970; LEIMEISTER, 1970; NEUNER, 1969). Die Reifung und Differenzierung des muskulären Systems ist zu diesem Zeitpunkt soweit fortgeschritten, daß Kontraktionen möglich sein müssen. Für eine geordnete und effektive motorische Aktivität ist aber auch eine synchrone Kontraktion, und damit eine prägende Wirkung des Nervensystems Voraussetzung.

Das bedeutet vom morphologischen Standpunkt aus, daß Nerven motorischer Neuronen in die Muskelanlagen eingewachsen sein müssen und daß zweitens funktionsfähige myoneurale Verbindungen sich gebildet haben müssen. Nicht zu vernachlässigen ist natürlich auch der die Reifung stimulierende Einfluß der Nerven (HOLTZER et al., 1956; STRAUS, 1946). Nerven, d.h. Bündel nackter, noch nicht myelinisierter Axone, nur von einer Schwann-Zell-Scheide umgeben, kommen elektronenmikroskopisch sicher nachweisbar am Tag 14 vor. Am Tag 16 sind auch enge räumliche Verbindungen von Axonen mit den Muskelfasern, die zahlreiche Vesikel enthalten, nachzuweisen. In Analogie zu vielen anderen nervösen Endformationen kann angenommen werden, daß es sich um Acetylcholin-haltige Vesikel handelt (Lit. siehe ZACKS, 1964). Im Zusammenhang mit der Diskussion des Funktionsbeginnes des motorischen Systems im Gesichtsbereich, ist natürlich diese Reifung der myoneuralen Verbindung besonders interessant. Die Entstehung typischer motorischer Endplatten fällt zwar nicht in den Zeitraum, in dem sich die Gaumenfalten heben und schließen. Für die Anordnung der Muskelfasern, ihre Ausrichtung, ihre mesenchymale Anheftung und Verankerung und nicht zuletzt für ihre zytologische Reifung sind aber trotzdem schon kontraktile Übung Voraussetzung. In Analogie zu anderen unreifen muskulären Systemen, besonders in der Gewebekultur, kann angenommen werden, daß jede Muskelfaser sofort nach Entwicklung eines kontraktilen Systems, sich beginnt in unterschiedlichen Abständen und wechselnder Schnelligkeit zusammenziehen. Da diese Bewegungen aber völlig unkoordiniert und nicht synchron verlaufen, zeigen sie nach außen keinen Effekt. Erst allmählich kommt es dann zu einem synchronen Verhalten des Muskelfaserverbands, das im Wesentlichen nervös bedingt ist. In unserem speziellen Falle erhebt sich die Frage, ob bereits die noch nicht voll ausgebildeten und zu motorischen Endplatten differenzierten axonalen Endabschnitte in der Lage sind, eine synchronisierende Wirkung auszuüben. Da in anderen muskulären Systemen derartige Vorgänge bereits nachgewiesen sind, kann auch hier angenommen werden, daß folgende Abschnitte durchlaufen sind (Lit. siehe MONTGOMERY, 1962; CUAJUNCO, 1940; BOYD, 1960):

I. nicht synchrone Kontraktionen von Einzelfasern.

- II. zunehmende Synchronizität durch Ausschüttung von Transmittersubstanzen aus undifferenzierten Axonabschnitten in den freien Raum (möglicherweise noch autonom).
- III. Ausbildung enger räumlicher Beziehungen zwischen axonalem Endstück und damit Entwicklung eines willkürlichen motorischen Verhaltens. Hier sind zweifellos noch viele Fragen offen, so daß der Spekulation viel Raum bleibt.
- IV. Ausbildung typischer motorischer Endplatten. Auf der Basis dieser Auslegungen ist deshalb zu vermuten, daß die unter Punkt III. genannten Verhältnisse, die am Tag 16 p.p. bei der Ratte erreicht sind, genügen, um effektive aber wahrscheinlich relativ langsame Bewegungen auszuführen.

Im Anfang der Diskussion wurde die Bedeutung des nervösen Systems und die Reifung der myoneuralen Verbindung für das Funktionieren eines Muskels bekannt. In diesem Zusammenhang und auch im Rahmen der Besprechung zytologischer Differenzierungsvorgänge ist aber der eigentliche Receptor und Weiterleiter der Erregung in der Zelle, der Ort der chemo - mechanischen Kopplung, das transversale und longitudinale System zu besprechen. Die regelmäßigen Einstülpungen der äußeren Zellmembrane (T-System) und ihre Berührung mit dem sarcoplasmatischen Relikulum (L-System) ist am Tag 16 oder 17 sicher noch nicht voll ausgebildet. Nur einzelne Kanäle und Vesikeltrauben stülpen sich von außen in die Muskelfaser ein. Auch die Berührungen mit dem L-System sind eher zufällig. Eine schnelle und vollständige Übertragung der Erregung in die Muskelfaser hinein kann also nicht angenommen werden. Trotzdem werden sich die dicht unter der äußeren Zellmembrane gelegenen Fibrillen bei Erregung der Membrane zusammenziehen können. Möglicherweise ist dieses Verhalten der Grund für das überwiegend periphere Entstehen der Myofibrillen. Zu einer völlig autarken motorischen Einheit gehört aber darüber hinaus noch die Möglichkeit der Kraftübertragung von der Muskulatur auf umgebene Gewebe, meistens auf Knochen. Dazu ist festes, sehniges Bindegewebe notwendig. In den Sehnenanlagen kommt bereits zu dem hier interessierenden Zeitpunkt (Tag 16) eine Interzellularsubstanz vor, die reich an Kollagenfibrillen ist. Sie weist allerdings noch nicht die endgültigen Fibrillendicken und die Faserausdehnung

und Textur des reifen Muskels auf (SCHWARZ und MERKER, 1973). Für die relativ geringe Belastung in der Amnionflüssigkeit des Uterus dürfte aber dieses Bindegewebe ausreichen. Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß vom rein morphologischen Standpunkt aus, das motorische System im Mund- und Zungenbereich in der Lage sein müßte, Bewegungen durch Muskelkontraktionen durchzuführen. Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Auffassung ist natürlich die Einstimmigkeit der Aussage, daß auch ohne reife motorische Endplatten und ohne vollständige Entwicklung des T- und L-Systems eine synchrone Kontraktion des Muskelverbandes möglich ist. Diese Vorstellung wird auch von anderen morphologischen Arbeiten bestätigt. Schweichel und Seinsch (1973) kommen zur ähnlichen Schlussfolgerung nach Auswertung der Befunde über die Zungenentwicklung der Ratte, wenn sie auch eine skeptische Haltung gegenüber rein morphologischen Befunden zeigen. Für einen Funktionsbeginn zum Zeitpunkt des Tages 16/17 sprechen auch Lipenbeobachtungen an Rattenembryonen (bzw. bei Mäuseembryonen 24 - 48 Std. früher), die Mundbewegungen, Kieferöffnungen und Dorsalflexion zu dieser Zeit nachweisen können. (MERKER, 1973 und WALKER, 1969). Auf der Grundlage dieser Befunde kann also angenommen werden, daß tatsächlich zu dem Zeitpunkt, an dem die Gaumenfalten sich heben und verschmelzen, d.h. der definitive Gaumen gebildet wird, die motorische Aktivität im Kopfbereich beginnt. Damit ist es berechtigt, die Vorstellung von der Beteiligung des morphologischen Systems an der Gaumenbildung zu diskutieren. Die Entfernung der Zunge zwischen den herabhängenden Gaumenfalten, zweifellos eine Voraussetzung für die spätere Elevation dieser Platten, wäre also durch Streckung der Zunge und Öffnung des Mundes möglich. Darüber hinaus wird durch die Dorsalflexion des Embryos der Unterkiefer frei und kann sich so besser senken, bzw. herabgezogen werden.

Die Vorstellung über die Beteiligung des muskulären Systems bei der Bildung des definitiven Gaumens könnte die Entstehung eines Teiles der Gaumenspalten erklären. Dafür sprechen einige vorläufige Befunde an Laboratoriumstieren, an denen mit inaktivierenden Substanzen, z.B. Curare, in der hier besprochenen kritischen Zeit Mißbildungen erzeugt werden (MERKER, 1973 siehe auch JACOBS, 1961).

Allerdings liegen auch andere Berichte vor, die bei ähnlichen Versuchsansatz keine Mißbildung erzeugen konnten. Darüber hinaus muß natürlich bei der Deutung dieser Versuchsergebnisse immer daran gedacht werden, daß über das Verhalten dieser Substanzen, über ihren Stoffwechsel, ihre Placentagängigkeit, Verteilung etc. noch nichts Sicheres bekannt ist. Außerdem können bei Gabe derartig hochwirksamer Substanzen Mehrfach-Effekte auftreten, möglicherweise auch über Beeinflussung mütterlicher Parameter. Interessant dabei ist, daß bei Menschen ein Mißbildungssyndrom vorkommt, bei dem die immer vorkommende Bewegungseinschränkung der Halswirbelsäule häufig vergesellschaftet ist mit einer Gaumenspalte, das Klippel-Feil-Syndrom. Diese Überlegungen und Befunde lassen es aber auf alle Fälle berechtigt erscheinen, weitere experimentelle Arbeiten, unter dieser Fragestellung und auf der Basis dieser Hypothese, durchzuführen.

Die eigentliche zytologische Differenzierung und Entwicklung der Muskeln in Mund- und Zungenbereich, entspricht prinzipiell den bisher von anderen Autoren, bei anderen Tieren und in anderen Muskelbezirken beschriebenen Verhältnissen (Zusammenfassende Literatur siehe SCHÜSSLER, 1971, 1973). Diese Entwicklung beginnt mit mitotisch sehr aktiven, aber sich noch nicht morphologisch differenzierenden einkernigen Myoblasten. Dann zeigen diese Zellen unter Verlust des Interzellularraumes ein starkes Adhäsionsverhalten. An den Stellen, wo die Membran benachbarter Zellen aneinander liegen, kommt es zu Auflösungserscheinungen. Mehrere Myoblasten fließen auf diese Weise zu langgestreckten mehrkernigen Muskelfasern zusammen. In diesen Muskelfasern beginnt dann auch die Bildung der Myofilamente, die sehr schnell zu typischen Myofibrillen zusammengelagert werden. Die weitere Entwicklung ist dann gekennzeichnet durch die zunehmende Vermehrung der Zahl der Myofibrillen. Gleichzeitig nimmt die Zahl der Mitochondrien zu. Sie ordnen sich im interfibrillären Raum an. Die Ausbildung eines speziellen Hohlraumsystems in der Muskelfaser in einer typischen 3-dimensionalen Ordnung (longitudinales und transversales System), erfolgt erst später. Auf der Grundlage dieser Befunde lassen sich einige, bereits in der Einleitung angedeutete Befunde diskutieren, die entweder bei der Ratte noch

nicht dargestellt und erörtert oder aber allgemein noch umstritten sind. Am Anfang der Diskussion wurde darauf hingewiesen, daß über die Herkunft und Wanderung der Ursprungszellen - zweifellos eines der umstrittensten Kapitel in diesem Zusammenhang - mit der elektronenmikroskopischen Methode keine Aussage gemacht werden kann. Das nächste, in diesem Zusammenhang zu besprechende Problem, ist der Mechanismus der Entstehung der vielkernigen Muskelfasern. Hier hat sich aber in letzter Zeit durch audioradiographische Untersuchungen und durch experimentelle Studien mit Mitosehemmern ziemlich eindeutig ergeben, daß eine Fusion von einkernigen Myoblasten anzunehmen ist. Die Teilung der Kerne nach DNS-Synthese innerhalb der Muskelfaser und damit die Entstehung einer vielkernigen Muskelfaser aus einem Myoblasten ist deshalb abzulehnen. Auch hier machen also die quergestreiften Muskeln des Gesichtsbereiches, die ja teilweise eine Sonderstellung einnehmen (kein knöcherner Ansatz bzw. Hautmuskel, Herkunft aus dem 2. Kiemenbogen), keine Ausnahme und entsprechen den bisher untersuchten anderen quergestreiften Muskeln (CAPERS, 1960; HOLTZER et al., 1958; KÖNIGSBERG, 1960; COLEMAN and COLEMAN, 1968; BISHOFF and HOLTZER, 1969; FIRKET, 1967; SHIMADA, 1971). Als 2., immer noch wenig verstandenes und deshalb umstrittenes Problem folgt dann die Ausrichtung der Myofibrillen in Längsrichtung der Faser bzw. der Kraftübertragung und Ordnung der Filamente innerhalb der Faser. (BISHOFF and HOLTZER, 1968; WARREN, 1969; KELLY, 1969; RASH et al., 1970; SCHÜSSLER, 1971; 1973). Bei Analyse der zeitlichen Ereignisse wird deutlich, daß bereits die ersten Myofilamente und Myofibrillen die spätere Vorzugsrichtung aufweisen. Eine richtende Aktion der Kontraktionen kann also nicht angenommen werden. Als ursächliche Mechanismen lassen sich 2 Faktoren diskutieren: einmal scheint die kettenförmige Anordnung der Myoblasten die spätere Ausrichtung vorwegzunehmen. Die Frage nach den Kräften, die für die Myofibrillenlokalisation wichtig sind, müßte dann anders formuliert werden: Durch welche Wirkungen ordnen sich die Myoblasten reihenförmig und verschmelzen dann? Hier kommen nur extrazelluläre Faktoren in Frage. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, daß das 3-dimensionale Netzwerk der Glukosaminoglykane unter kollagenen Fibrillen trajektorielle Systeme bildet, entsprechend den herrschenden Kraftlinien. In diese Systeme werden dann die Zellen sekundär eingepaßt. Daß derartige Vorgänge tat-

sächlich vorkommen, konnte an der sich entwickelnden Corner morphologisch dargestellt werden (HACKELBERG, 1971. MERKER und GÜNTHER, 1973). Nach Ablösung der Linse vom Ektoderm entsteht zwischen beiden Strukturen ein zellfreier Raum, der nur Glykosaminoglykane und wenig Kollagen enthält. Sekundär wandern Mesenchymzellen geordnet ein und bilden dann schließlich mit den allmählich in immer größeren Mengen an gebildeten kollagenen Fibrillen ein hochgeordnetes 3-dimensionales Netzwerk. Eine andere Möglichkeit, die Ausrichtung der Myofibrillen zu prägen, sind intrazelluläre Faktoren. Hier käme ein makromolekulares, zytoplasmatisches Raumgitter in Frage, das die Ausrichtung prägt. Diskutiert wurden in diesem Zusammenhang Mikrotubuli und Filamente.

Während in einzelnen Muskelfaserarten tatsächlich Mikrotubuli nachgewiesen werden konnten (SCHÜSSLER, 1971, 1973), deren starre mechanische Eigenschaften bekannt sind, konnten wir solche Strukturen in unserem Material nicht darstellen. Allerdings ist ihre Labilität während der Präparationen bekannt, so daß ein Fehlen im elektronenmikroskopischen Bild noch nicht ihr wirkliches Fehlen beweist. In unseren Bildern gelang es aber relativ unregelmäßig verlaufende Filamente nachzuweisen, die für eine ausrichtende Wirkung ebenfalls verantwortlich gemacht werden können. Diese etwa 100 Å dicken, unregelmäßig verlaufenden Filamente könnten typische Myofilamente darstellen, die sich entsprechend später erst ordnen. Dagegen sprechen die unterschiedlichen Dicken im Vergleich zu Myosin- und Aktinfilamenten und das Fehlen von Übergangsbündelungen in Richtung auf Myofibrillen. Es könnte sich also durchaus um ein sogenanntes primitives kontraktiles Netzwerk handeln, wie es in Einzellern und amöboid beweglichen Zellen nachgewiesen werden konnte (Lit. siehe v. KEYSERLINGK, 1968, 1969). Dieses kontraktile System könnte durch Kontraktionen den Zelleib auf der einen Seite verkleinern, auf der anderen Seite aber auch sekundär verlängern. Die Folge wäre eine entsprechende Anordnung der Makromoleküle des Grundzytoplasmas, in die sich dann die Myofilamente einlagern.

Nach unseren elektronenmikroskopischen Bildern wird die Ausrichtung der Myofilamente bereits während ihrer Bildung an den Ribosomen bzw. Polysomen geprägt. Die enge räumliche Verbindung zwischen Filament und Ribosomen zeigt die Richtigkeit der Vorstellung,

daß Proteine an diesen Granula gebildet werden, auch für die Muskelzelle. Speziell in diesem sich entwickelnden Muskel kommen aber Polysomen in einer ganz besonderen Gruppierung vor. Sie sind häufig in Form langgestreckter Haufen oder sogar einer Helix angeordnet, in deren Längsachse das Filament aufwächst (WADDINGTON and PERRY, 1963). Die Helices und die entsprechenden Filamente kommen aber von vornherein in typischer Lage vor. Auch durch diesen Befund wird also die Fragestellung verschoben. Die Frage lautet jetzt nicht, wie wird der Verlauf der Filamente, sondern wie wird die Lage der Polysomen geprägt. Auch hier kommen die weiter oben diskutierten Mechanismen in Frage.

Die Ordnung der Myofilamente innerhalb der Myofibrille, d.h. eine hexagonale Packung von Myosinfilamenten um ein Aktinfilament, erfordert zweifellos eine hohe Ordnung auch im Molekularbereich. Hier läßt sich im Schnitt mit dem Elektronenmikroskop nichts Sicheres mehr aussagen. In Analogie zu Untersuchungen an isolierten Filamenten und zu biochemischen Resultaten kann aber angenommen werden, daß die Seitenketten des Myosins und die ATP-Brücken eine wichtige Rolle spielen.

Als stabilisierendes Element muß auch der Z-Streifen erwähnt werden. Das Z-Streifenmaterial mauert die dünnen Myosinfilamente so ein, daß sie zumindest am Ende eines jeden Sarkomers festverankert sind. Die in manchen Muskelgeweben verschiedener Spezies diskutierten Probleme der Entstehungssequenz der Myofilamente, ihrer Ordnung und die Bedeutung des Z-Streifens, spielen hier keine Rolle (KELLY, 1969; RASH et al., 1970). Offenbar entwickeln sich Myofilamente und Z-Streifen relativ gleichzeitig, so daß ihre schnell entstehende Ordnung von Anfang an stabilisiert werden kann.

Zusammenfassung

Bei Rattenembryonen des Schwangerschaftstages 12 bis zur Geburt wurde die Entwicklung der Gesichts- und auch der Zungenmuskulatur licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Am Tag 13 bilden sich typische Muskelblasteme. Ab Tag 15 fließen die einkernigen Myoblasten dieser Blasteme zu vielkernigen Muskelfasern zusammen, die sehr schnell mit der Synthese von Myofilamenten beginnen. Am Tag 16 sind bereits Muskelfasern vorhanden, die reichlich Myofibrillen enthalten. Zu diesem Zeitpunkt bekommen auch einwachsende Axone ersten Kontakt mit den Muskelfasern und bilden charakteristische Vesikel an diesen Stellen. Parallel zu diesen Vorgängen entwickelt sich das Bindegewebe, d.h. Bündel noch dünner kollagener Fibrillen. Die zytologische Reifung der Muskelfasern bei Rattenfoeten erlaubt also vom morphologischen Standpunkt aus zum Zeitpunkt des Gaumenschlusses (Tag 16) den Schluß, daß eine Kontraktion möglich ist. Die Übertragung der Verkürzungskraft auf andere Strukturen scheint bei Vorhandensein von kollagenen Fibrillen ebenfalls möglich zu sein. Unsicher ist die funktionelle Einschätzung des Nervensystems und der myoneuralen Verknüpfung. Unterstellt man, daß eine lockere Anlagerung von Vesikelhaltigen, d.h. acetylcholinhaltigen Endabschnitten und das Reagieren weniger, vorwiegend peripherer Myofibrillen zur Erregungsübertragung genügt, könnte eine synchrone Kontraktionsfähigkeit bei Rattenfoeten des Tages 16 im Gesichtsbereich vermutet werden. Damit müßte aber eine Beteiligung der Muskeln an der Morphogenese des Gesichtes, besonders des definitiven Gaumens postuliert werden.

Literaturverzeichnis

- Bischof, R.: The effect of mitotic inhibitors on
Holtzer, H.: myogenesis, in vitro.
J. Cell. Biol. 36, 111-27 (1968)
- Bischof, R., Holtzer, H.: Mitosis and the process of differentiation
of myogenic cells in vitro.
J. Cell Biol. 41, 188-200 (1969)
- Blehschmidt, E.: Vom Ei zum Embryo
DVA (1968)
- Blehschmidt, E.: Der menschl. Embryo
Schattner-Verlag, Stuttgart (1963)
- Blunk, M.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen
am Epithel der Gaumenfortsätze von Ratten-
embryonen (Tag 14-18).
Diss.Med.Fak.FU Berlin (1970)
- Brachet, L.: The Biochemistry of development.
Academic Press, New York-London (1961)
- Brand, P.W.: Correlated morphological and physiological
studien on isolated single muscle fiber. I
Fine Structure of the crayfish muscle fiber
J.Cell.Bio. 25 (Suppl.): 233-60 (1965)
- Brechler, K.R.: Gaumenschluß in vitro bei Rattenembryonen,
Merker, H.-J.: in: 1. Symposium des Sonderforschungsbe-
reiches 29, Fu, Berlin (1970) im Druck
- Boyd, I. D.: Development of striated muscle
in: Structure and function of muscle.
(ed.by Bourne) Academic Press, New-York-Lon-
don, 1, 63-85 (1960)
- Burdi, A.R.: Distribution of midpalatine cysts: A Reava-
luation of human palatal closure mechanism.
in: J. Oral Surg., 26, 41-65 (Jan.1968)
- Burdi, A.R., Faist, K.: Morphogenesis of the palate in normal human
embryos with special emphasis on the mecha-
nism involved in: Am. J.Anat., 120.
149-159 (1967)
- Capers, C.R.: Multinucleation of skeletal muscle in vitro
J. biophys. biochem. Cytol. 7, 559-66 (1960)
- Coleman, J.R.: Muscledifferentiation and makromolekular
Colemann, A.W.: synthesis.
J. Cell.Physiol. 72, 3-18 (1968)

- Credner, K.R.; Zum Problem der Unterkieferentwicklung bei menschlichen Embryonen. (Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen) Diss. Med. Fak. FU Berlin (1972)
- Cuajunco, F.: Development of neuromuscular spindles in human fetuses. Contrib. Embryol. Carnegie Inst. 28, 97-128 (1940)
- Dessouky, D.A., Hibbs, R.G.: An electron microscope study of the development of the somite muscle of the chick embryo. Amer. J. Anat. 116, 523-33 (1965)
- Drillien, C.M., Ingram, T.T.S., Wilkinson, E.M.: The causes and natural history of cleft lip and palate. in: Williams and Wilkins Company, Baltimore (1966)
- Ezermann, E.B., Ishikawa, H.: Differentiation of the sarcoplasmatic reticulum and T-System in the developing chick skeletal muscle in vitro. J. Cell. Biol. 35, 305-20 (1967)
- Firket, H.: Ultra structural aspects of myofibril formation in cultured skeletal muscle. Z. Zellforsch. 78, 313-27 (1967)
- Fraser, F.C.: Etiology of cleft lip and palate. in: cleft lip and palate eds. Little, Brown, Boston pp. 54-55 (1971)
- Fraser, F.C., Chew, D., Verusio, A.C.: Oligohydramnios and cortisone-induced cleft palate in the mouse. Nature 214, 417-18 (1967)
- Fraser, F.C.: Relation of face shape to susceptibility to congenital cleft lip. J. med. Genet. 7, 112-17 (1970)
- Fraser, F.C., Walker, B.E., Trasler: Experimental production of congenital cleft palate, genetic and environmental factors. Pediatrics, 19, 782-87 (1957)
- Gonzales, A.W.: The prenatal development of behavior in the albino rat. J. Comp. Neurol. 75, 395-442 (1932)
- Hackelberg, H.H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung u. Reifung des CorRea-stromas bei der Ratte. Disst.: Med. Fak. FU Berlin (1971)

- Hamilton, W.J., Boyd, J.D.,
Mossman, H.W.: Human Embryology
Williams and Wilkins, Baltimore (1972)
- Hay, E.D.: The fine structure of differentiating
muscle in the salamander tail.
Z.Zell.forsch.Mikrosk.Anat.69, 6-34 (1963)
- Holtzer, H., Lash, I.,
Holtzer, S.: The enhancement of somitic muscle maturation
by embryonic spinal cord.
Biol.Bull.111, 303-4 (1956)
- Humphrey, T.: The relations between human fetal mouth
opening reflexes and closure of the palate
Am. J.Anat.125, 317-44 (1969)
- Humphrey, T.: The dynamic mechanism of palatal shelf
elevation in human fetuses.
Anat.Rec.160, 369 (Abstr.), (1968)
- Ishikawa, H.: In vitro formation of elaborate network of
T-System tubules in developing chick skeletal
muscle.
J.Cell.Biol.35, 61 A (Abstr.), (1967)
- Ishikawa, H.: Formation of elaborate network of T-System
tubules in cultured skeletal muscle with
special references to the T-System formation
J.Cell., Biol.38, 51-66 (1968)
- Jacobs, R.M.: Failure of muscle relaxants to produce
cleft palate in mice.
Teratology 4, 25-30 (1971)
- Kelly, A.M., Zacks, S.I.: The histogenesis of rat intercostal
muscle.
J.Cell.Biol. 42, 135-53 (1969)
- Kelly, A.M., Zacks, S.J.: The fine structure of motor endplate morphogenesis.
J.Cell.Biol. 42, 154-69 (1969)
- v.Keyserlingk, D.: Feinstruktur des kontraktiven Systems in
Fibroblasten.
Naturwissenschaften, 55, 549 (1968)
- v.Keyserlingk, D.: Kontraktilität und Ultrastruktur Glycerin-
extrahierter Fibroblasten aus der Gewebekultur.
Protoplasma 67, 391-406 (1969)
- Königsberg, I.R.: The dissociability of deoxyribonucleic acid
synthesis from the development of multicellularity
of muscle cell in culture.
J.Biophys.Biochem.Cytol.8, 333-43 (1960)

- Leimeister, M.L.: Das elektronenmikroskopische Bild der Nerven und Gefäße in den Gaumenfortsätzen und im definitiven Gaumen bei Rattenembryonen (Tag 14-17) in: Diss.Med.Fak.Fu Berlin (1970)
- Merker, H.J.: Unveröffentlichte Befunde (1973)
- Montgomery, R.D.: Growth of human striated muscle Nature 195, 194-95 (1962)
- Needham, I.: Biochemistry and Morphogenesis. Cambridge (1950)
- Neuner, B.: Das elektronenmikroskopische Bild des Mesenchyms der Gaumenfalten bei Rattenembryonen (Tag 14-17) Diss.Med.Fak.Fu Berlin (1969)
- Przybilsky, R.J., Blumberg, J.M.: Ultrastructural aspects of myogenesis in the chick. Lab.Invest.15, 836-63 (1966)
- Rash, I.E., Shay, I.W., Bieseke, I.I.: Preliminary biochemical investigation of the intermediate filaments. J. Ultrastr.Res.33, 399-407 (1970a)
- Rash, I.E., Bieseke, I.I., Sey, G.O.: Three classes of filaments in cardiac differentiation. J. Ultrastr.Res.33, 408-35 (1970b)
- Schüssler, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Muskelentwicklung in der hinteren Extremität von Hühnerembryonen. Diss. an der Fu Berlin (1971)
- Schüssler, R.: Die Entwicklung des Muskelsystems in der hinteren Extremität von Hühnchen. Acta Anatomica, im Druck (1973)
- Schwarz, W.: Merker, H.J.: Unveröffentlichte Befunde (1973)
- Schweichel, J.U.: Die Entwicklung des Bewegungsapparates der Rattenzunge im Licht- und Elektronenmikroskop. Z.Anat. Entw.-Gesch., im Druck (1973)
- Shimada, Y.: Electron-microscope observations on the fusion of chick myoblasts in vitro. J.Cell.Biol.48, 128-42 (1971)
- Spemann, H.: Experimentelle Beiträge zur Theorie der Entwicklung. Springer-Verlag, Berlin (1936)
- Stark, D.: Embryologie Thieme-Verlag, Stuttgart (1965)

- Straus, W L.: The concept of nerve-muscle specificity,
Biol.Rev. 21, 75-91 (1946)
- Thompson: Hist~~o~~chemical and Histopathological
methods. (1966)
- Trasler, D.G.: Walker, B.E., Congenital malformations produced by
Fraser, F.C.: amnioticsac puncture.
Science 124, 439 (1956)
- Waddington, C.H., Perry, M.M.: Helical arragement of ribosomes in diffe-
rentiating muscle cells.
Exp.Cell.Res.30, 599-60 (1963)
- Walker, B.E.: Correlation of embryonic movement with
palate closure in mice.
in: Teratology 2, 151-98 (1969)
- Waren, R.H.: The effect of colchicine on the myogenesis
in vivo in rana pipiens and rhodnius
prolixus.
J.Cell.Biol.38, 544-45 (1968)
- Zacks, S.I.: The motor endplate.
Saunders, Philadelphia (1964)
- Ziegler, H.E.: Der jetzige Stand des Kopfproblems
Anat. Anz. 57 (1953)

Bildmaterial

Abb. 1) Schwangerschaftstag 15, Ratte.

A. Basis der Zungenanlage (Z) mit umschriebenen Muskelblastemen (x). PM-primäre Mundhöhle

B. Schrägschnitt durch die Gesichtsanlage mit Knorpelblastem (x) und Muskelblastem (*).

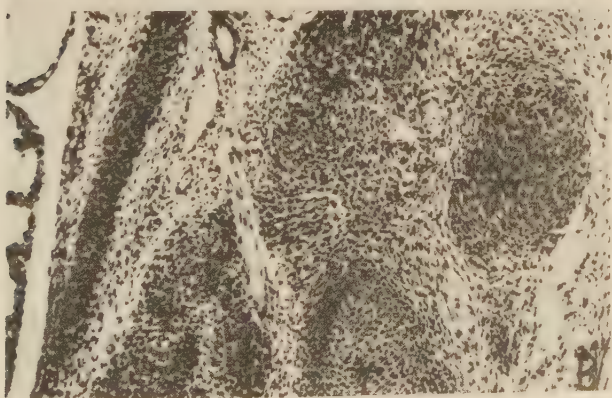


Abb. 2) Schwangerschaftstag 16, Ratte.

- A. Schnauzenbereich mit vielschichtigem verhornten Epithel (E), Vibrissae (x) und Muskelfasern (↓).
- B. Querschnitt im basalen Bereich des Kopfes mit primitiver Mundhöhle (PM), auslaufenden Gaumenfortsätzen (x), Zahnanlagen (↓), Meckelscher Knorpel (★) und Muskelfasern der Wangen- bzw. Kaumuskulatur (M).

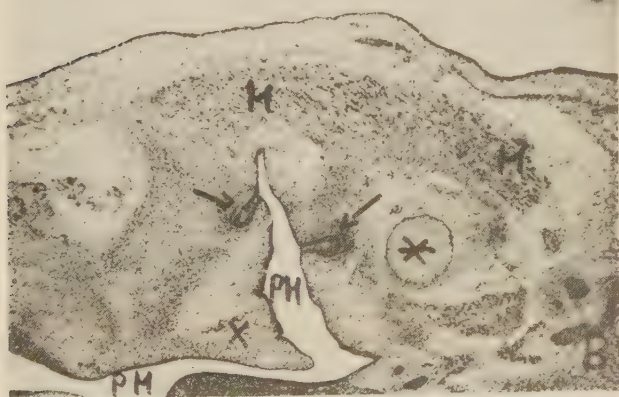
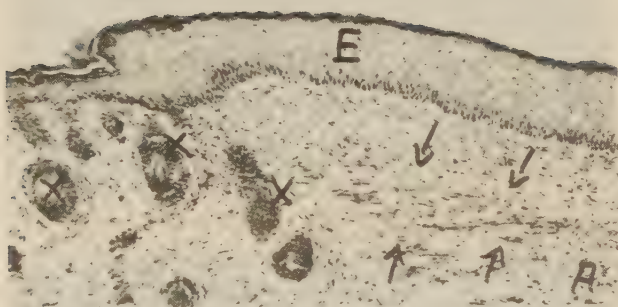
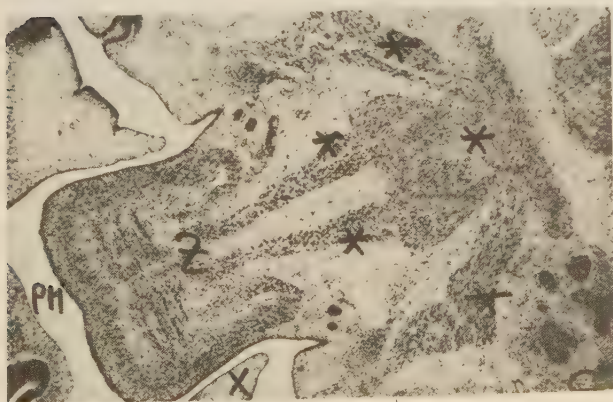
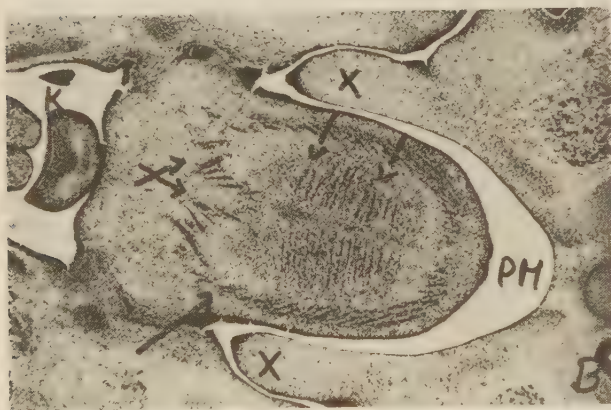
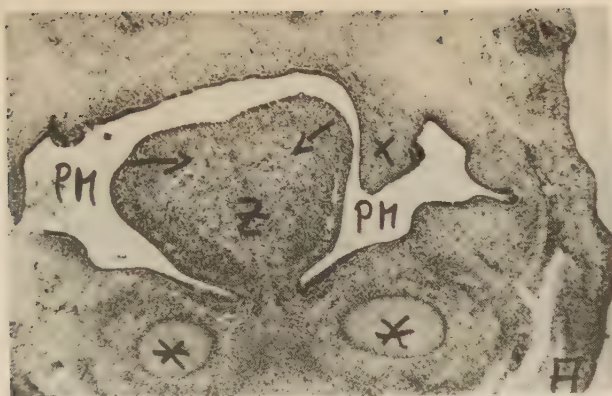
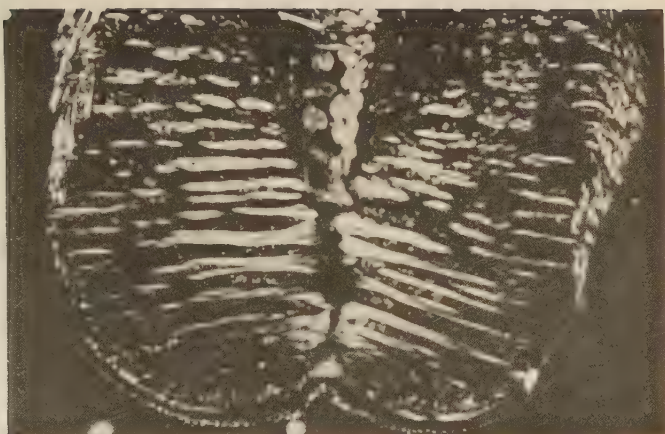


Abb. 3) Zungenanlagen von Rattenfoeten.

- A. Schwangerschaftstag 15, Ratte.
Zungenanlage (Z), primitive Mundhöhe (PM), Gaumenfortsatz (x), Meckelscher Knorpel (*), in der Muskelanlage erste Muskelfasern (↓).
- B. Schwangerschaftstag 16, Ratte.
Bereits deutlich ausgeprägte Faserstruktur der Zungenmuskulatur (↓), Gaumenfalten (x), primäre Mundhöhe (PM), Kehlkopföffnung (K).
- C. Wie A. mit etwas anderer Schnittrichtung und Darstellung der Zungenbeinmuskulatur (*).



A . 4) Polarisationsoptische Aufnahme zur Darstellung
des Muskelfaserverlaufes in der Zunge eines Rat-
tenfoeten vom Tag 19.



- Abb. 5) Schräg- und Tangentialschnitte durch die Anlagen der Wagenmuskulatur von Rattenfoeten, Acetylcholinesterase-nachweis.
- Schwangerschaftstag 16 - früh.
- A. Diffuse Anfärbung der Muskelfasern (↓) mit beginnender Verdichtung der Reaktion in umschriebenen Bezirken (X)
- B. wie A.
- C. Schwangerschaftstag 16 - spät
Zunehmende Konzentration der positiven Bezirke (X)
- D. wie C.

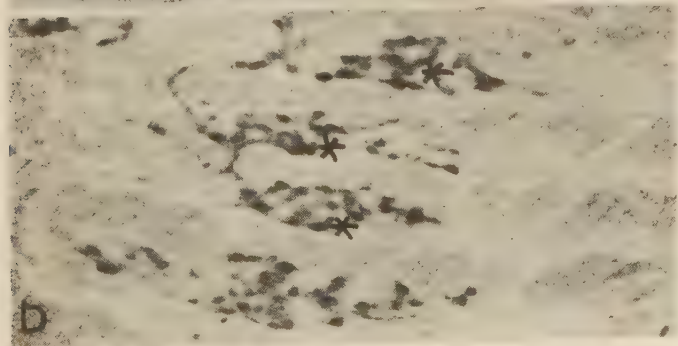
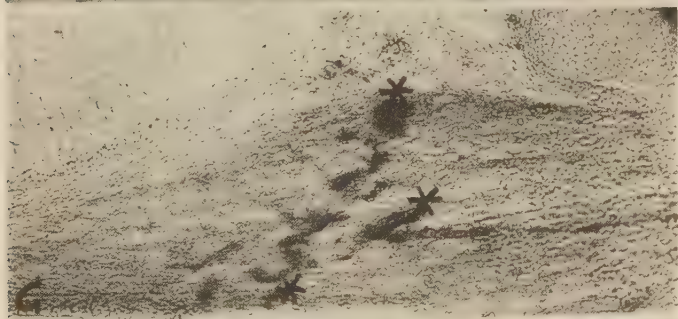
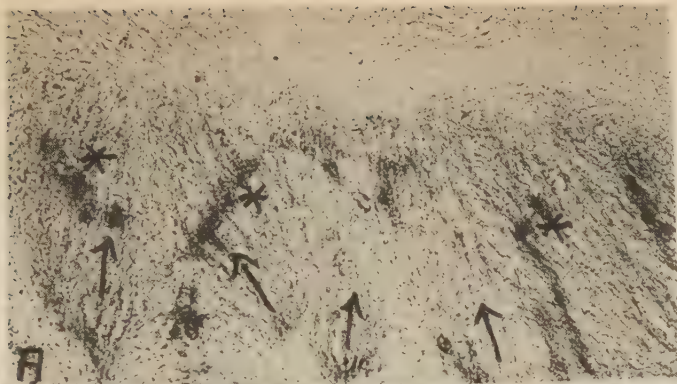


Abb. 6) Acetylcholinesterasenachweis in den Zungen erwachsener Ratten. Neben einigen verstreut liegenden motorischen Endplatten (O) gerichteter Ordnung dieser Struktur auf einer bestimmten Höhe ($\downarrow$).

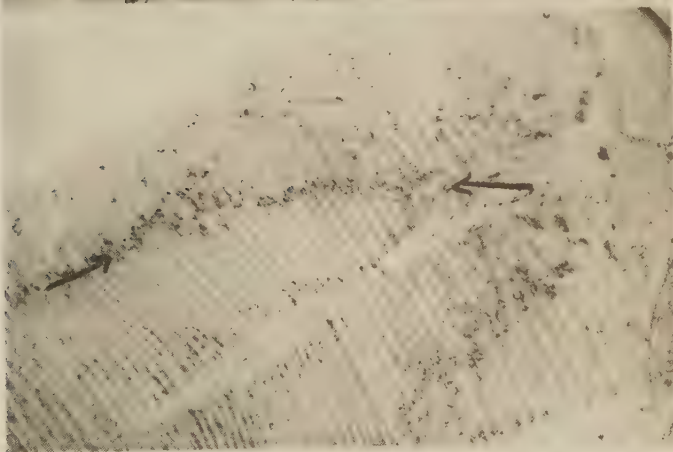
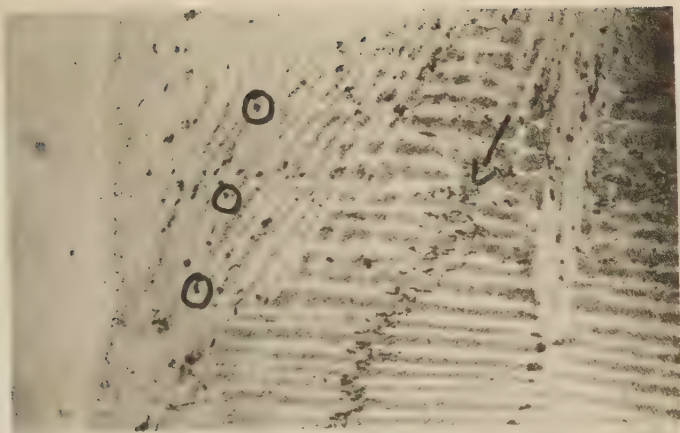


Abb. 7) Muskelblastem aus dem Wangenbezirk.

Schwangerschaftstag 13, Ratte.

Dichtgepackte Zellen in engen Kontakt (↓), Nucleus (N),
Nucleolus (No), Im Zytoplasma reichlich freie Ribosomen (o),
Mitochondrien (M) und Hohlräume des rauhen endoplasmatischen
Retikulums (~~x~~), (x) Interzellularraum,

Vergrößerung 1 : 10 500



Abb. 8) Schwangerschaftstag 15, Ratte.

Beginnende Myofibrillenbildung (MF) mit angedeutetem Z-Streifen (↓), einkernige Myoblasten (MB), Mitochondrien (M), freie Ribonomen (o), im Grundzytoplasma (✱) zahlreiche, feine unregelmäßig verlaufende Fibrillen.

Vergrößerung 1 : 21 000

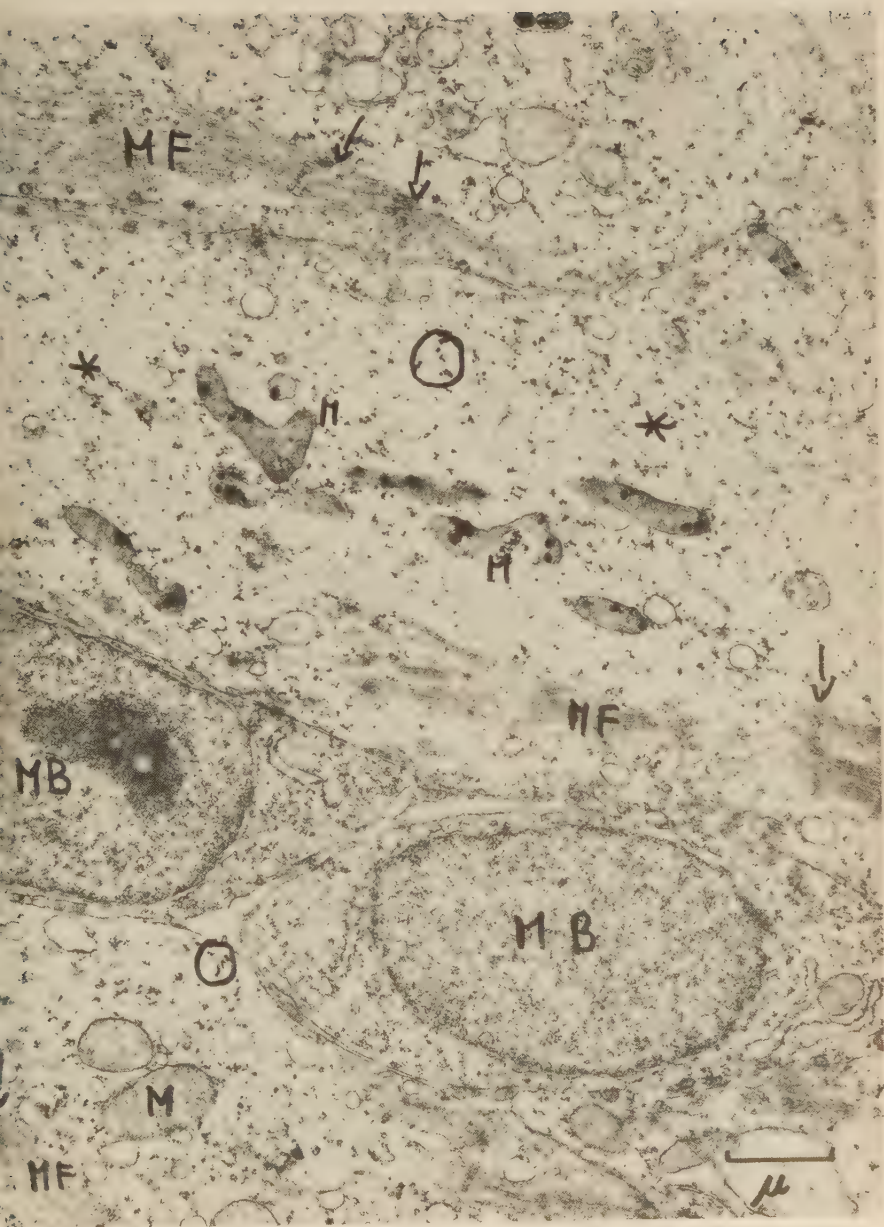


Abb. 9) wie 8, bei höherer Vergrößerung.

Im Zytoplasma hochgeordnete Polysomen Systeme ($\downarrow$) und andere freie Ribosomenaggregate (o). Nucleus (N), Nucleolus (No), Myofibrillen (MF), Z-Streifen (*), Mitochondrien (M), Interzellularraum (I).

Vergrößerung 1 : 70 000



Abb. 1a) Schwangerschaftstag 18, Ratte.

Nach weitgehend Leere (I) oder aber myofibrillenreiche Muskelfasern (II), Fibroblasten (F) mit reichlich rauhen endoplasmatischen Retikulum. Mesenchymzelle in Mitose (MI) Myoblast (MB), Muskelfaserkern (N)

Vergrößerung 1 : 21 000

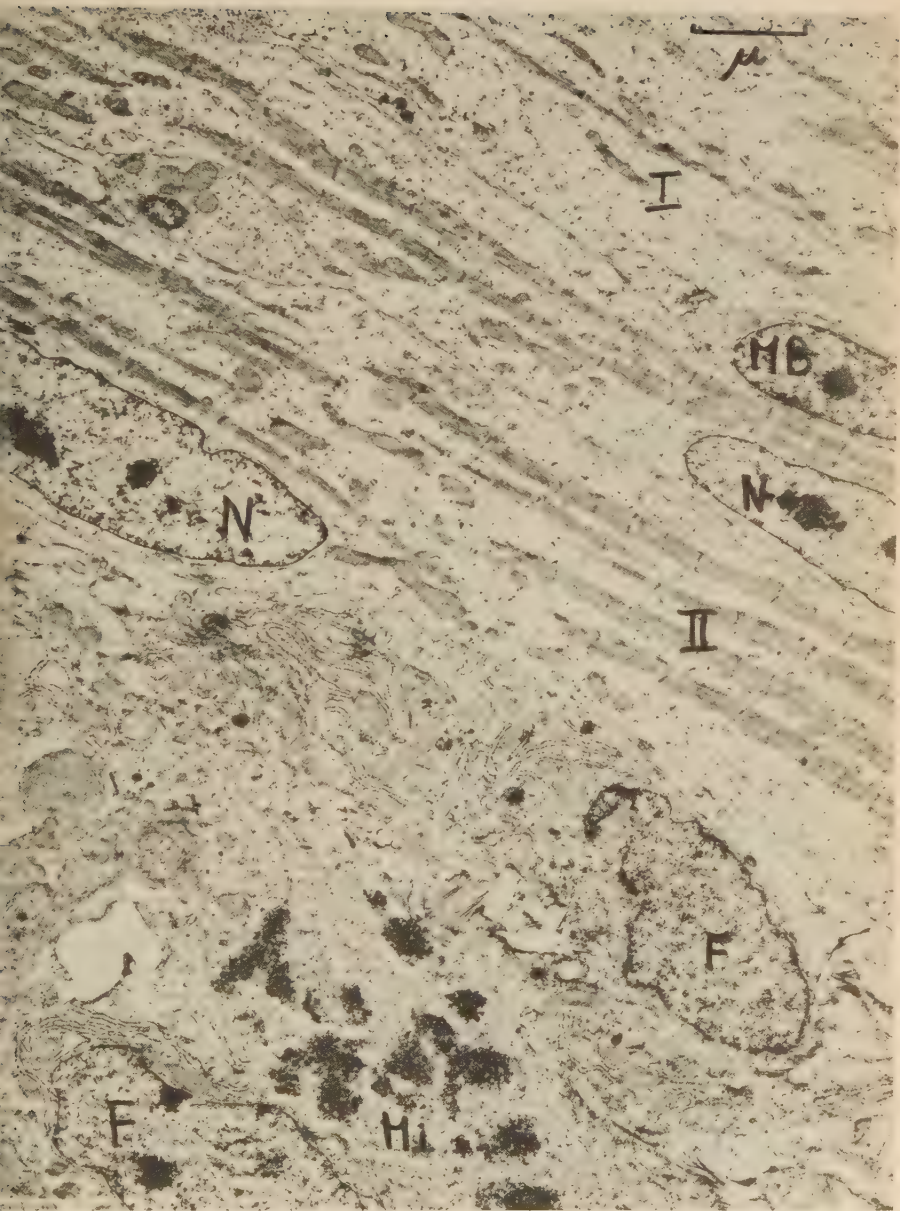


Abb. 11) Schwangerschaftstag 20, Ratte.

Querschnitt durch Muskelfasern mit zahlreichen Myofilamentbündeln (x) und einer angedeutet peripheren Lagerung (N), Fibroblasten im Interstitium (F), kollagene Fibrillenbündel in der Muskelperipherie (k)

Vergrößerung 1 : 21 000

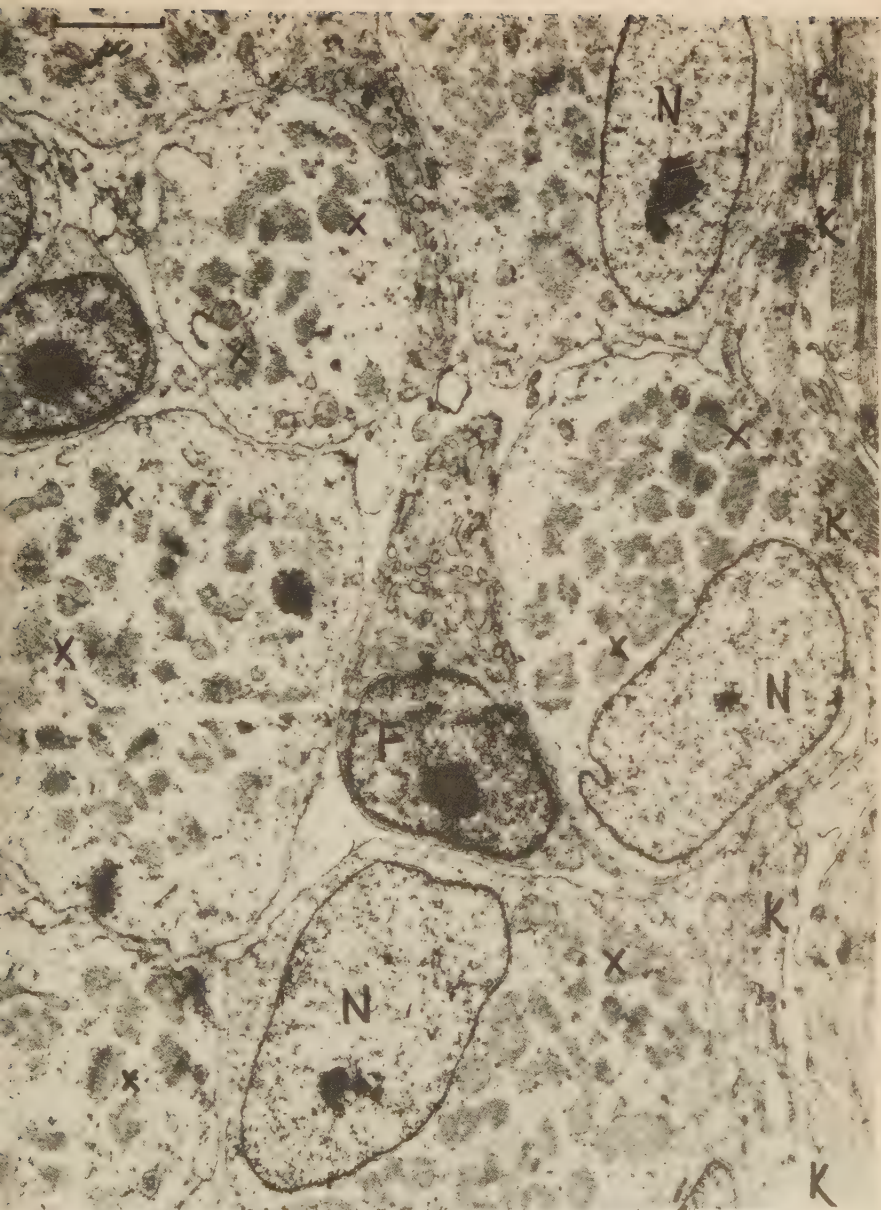


Abb. 12) wie 11. im Längsschnitt.

Myofibrille (MF), Z-Streifen (↓), Mitochondrien (M),
Interstitieller Raum (I), mit Fortsätzen von Mesenchym-
zellen, angedeutete Basalmembran (*).

Vergrößerung 1 : 21 000

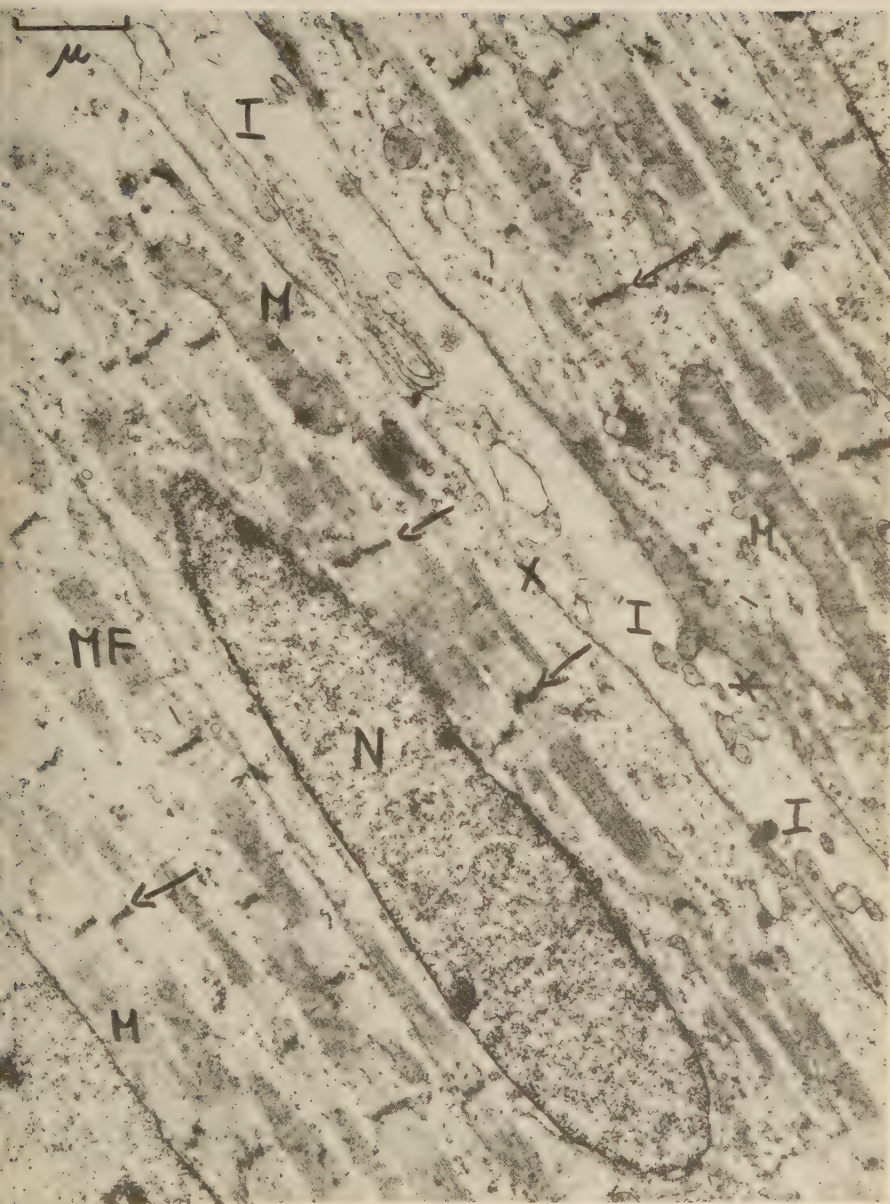


Abb. 13) wie 11.

I-Band (I), A-Band (A), Z-Streifen ($\downarrow$), M-Streifen (~~50~~),
größere Mengen Sarkoplasmatischen Retikulums (x) vorwiegend
auf Höhe des Z-Streifens.

Vergrößerung 1 : 35 000

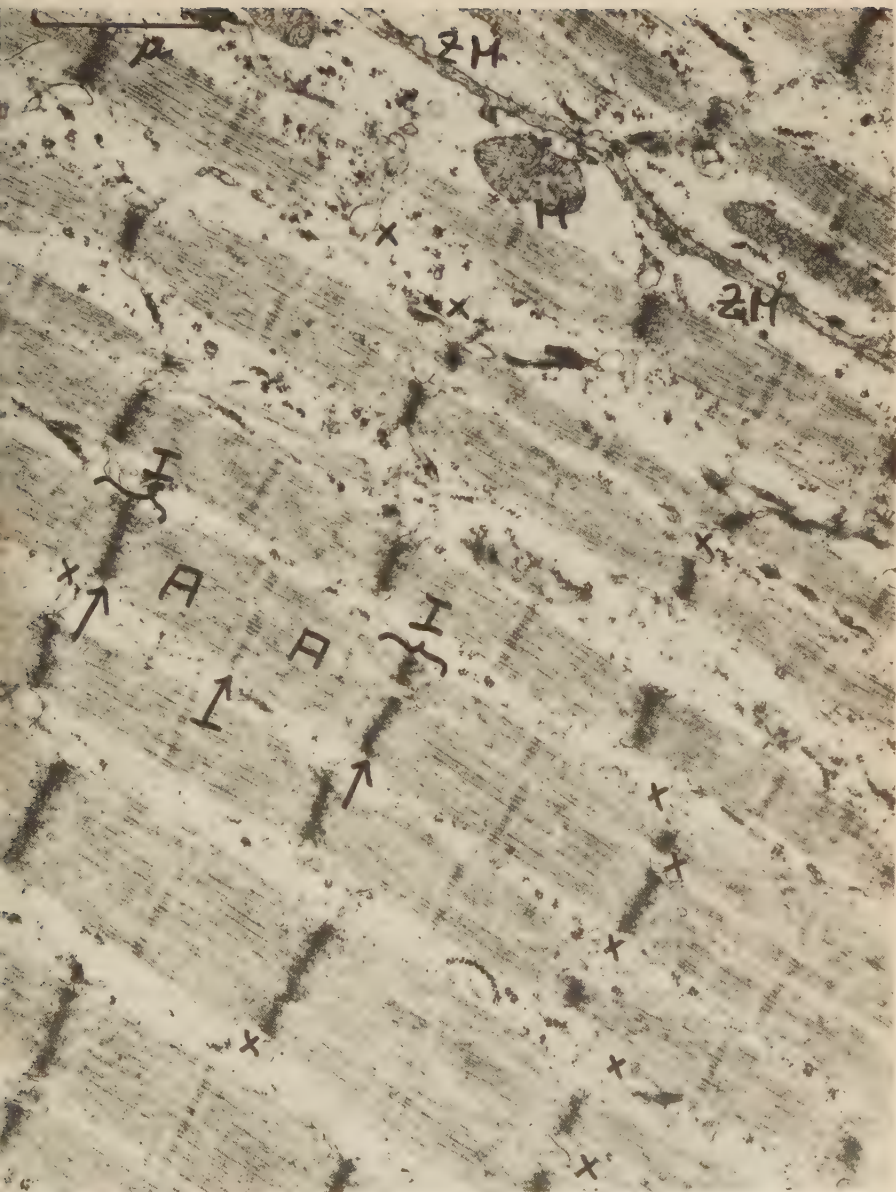


Abb. 14) Schwangerschaftstag 15, Ratte.

Myoblast (MB), Muskelfaser (M), möglicherweise kurz vor oder während der Verschmelzung ($\downarrow$), großer Fibroblast (F) mit zahlreichen Hohlräumen rauhen endoplasmatischen Retikulums (x), Golgiapparat (G), Mitochondrien (Mi), freie Ribosomen (o)

Vergrößerung 1 : 21 000

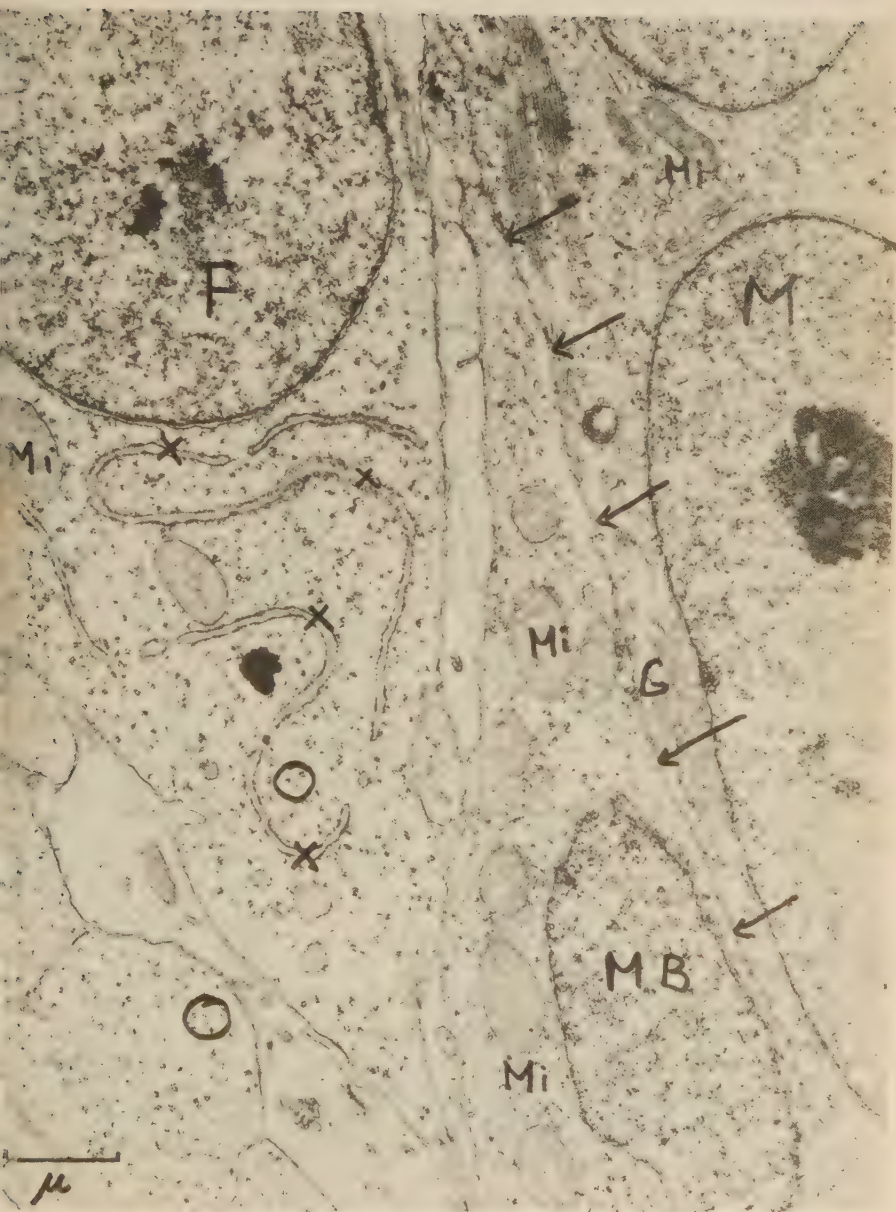


Abb. 15) Schwangerschaftstag 20, Ratte.

Anschnitt von 2 Fibroblasten ($F_1 F_2$), Verbindung des ausgeprägten rauhen endoplasmatischen Retikulums (*) mit der perinucleären Zisterne, im Interzellularraum dünne Filamente (↓) und Bündel quergestreifter kollagener Fibrillen im Längsschnitt (I) und Querschnitt (II).

Vergrößerung 1 : 70 000



Abb. 16) Schwangerschaftstag 16, Ratte.

Neben Muskelfasern (M) ein kleiner Nerv mit gebündelten Axonen (A) und eine Schwannzellhülle (S). Im mesenchymalen Interzellularraum (I) zahlreiche Anschnitte von Fibroblasten fortsätzen.

Vergrößerung 1 : 10 500

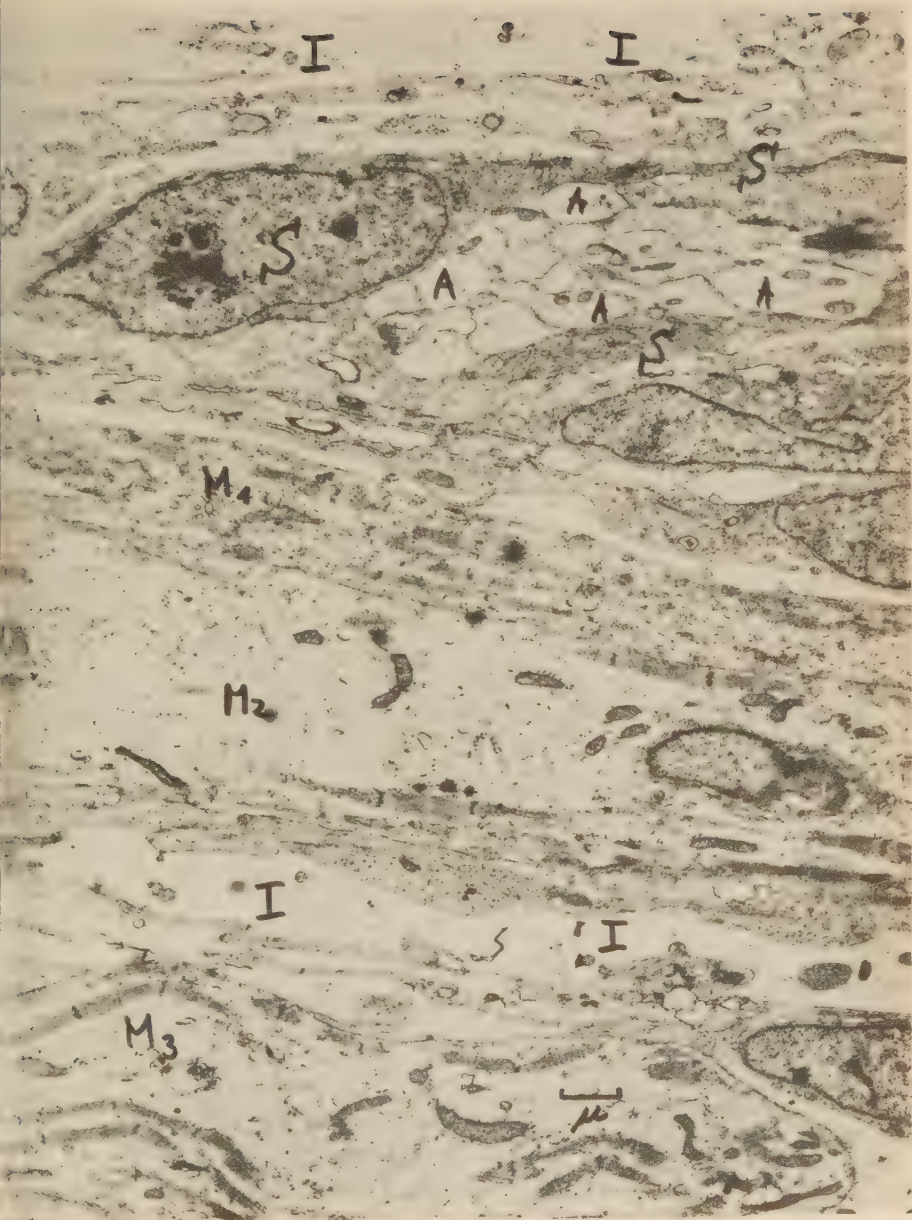


Abb. 17) Schwangerschaftstag 17, Ratte.

Muskelfaser mit 2 Myofibrillen (MF) in dichter Nachbarschaft zu 2 vesikelreichen Axonabschnitten (A). Fortsätze der Schwannschen Zelle (S)

Vergrößerung 1 : 56 000

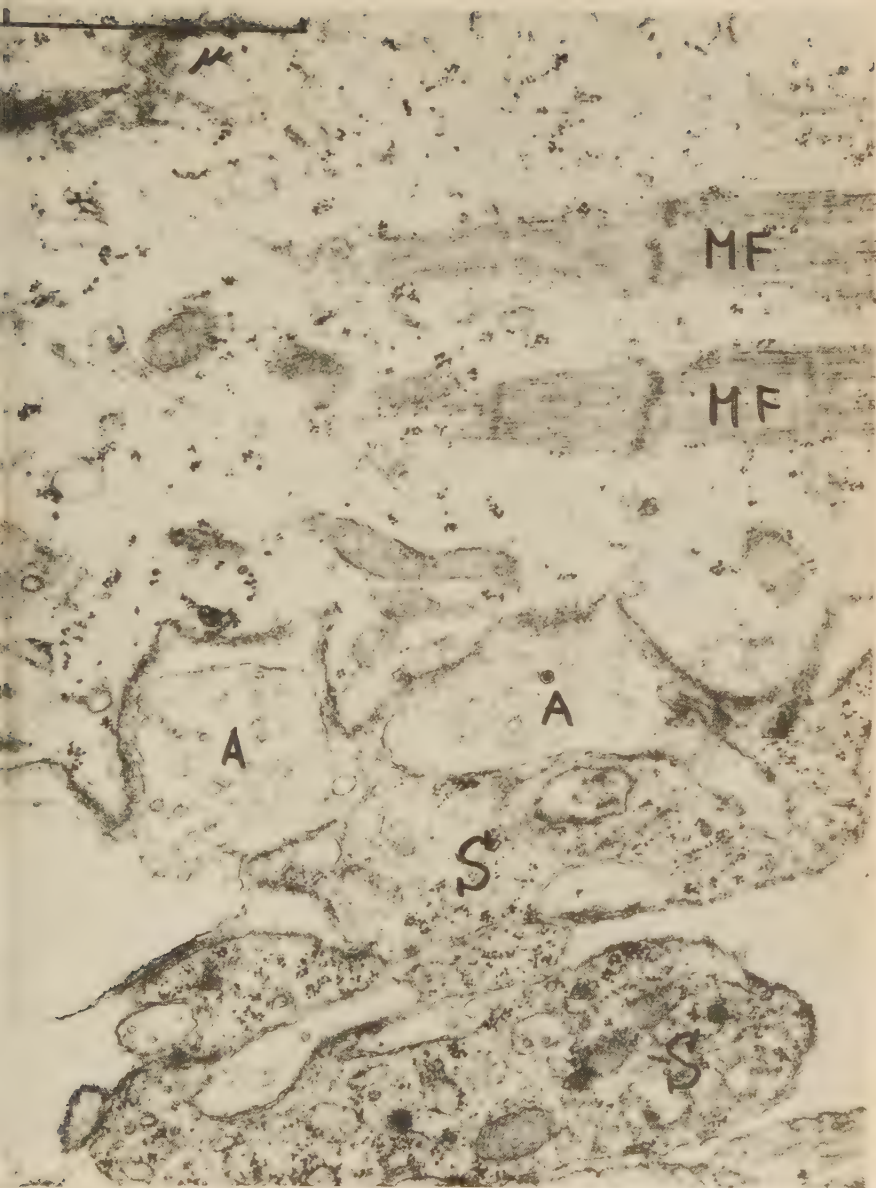


Abb. 18) Schwangerschaftstag 20, Ratte.

Muskelfasernahe Axone (A) mit Vesikeln und "dense core
grannules" Axone teilweise schon von Schwannschem Zytoplasma
umscheidet (↓), Schwannzellkern (S), Myofibrille (MF),
Mitochondrien (M).

Vergrößerung 1 : 52 000

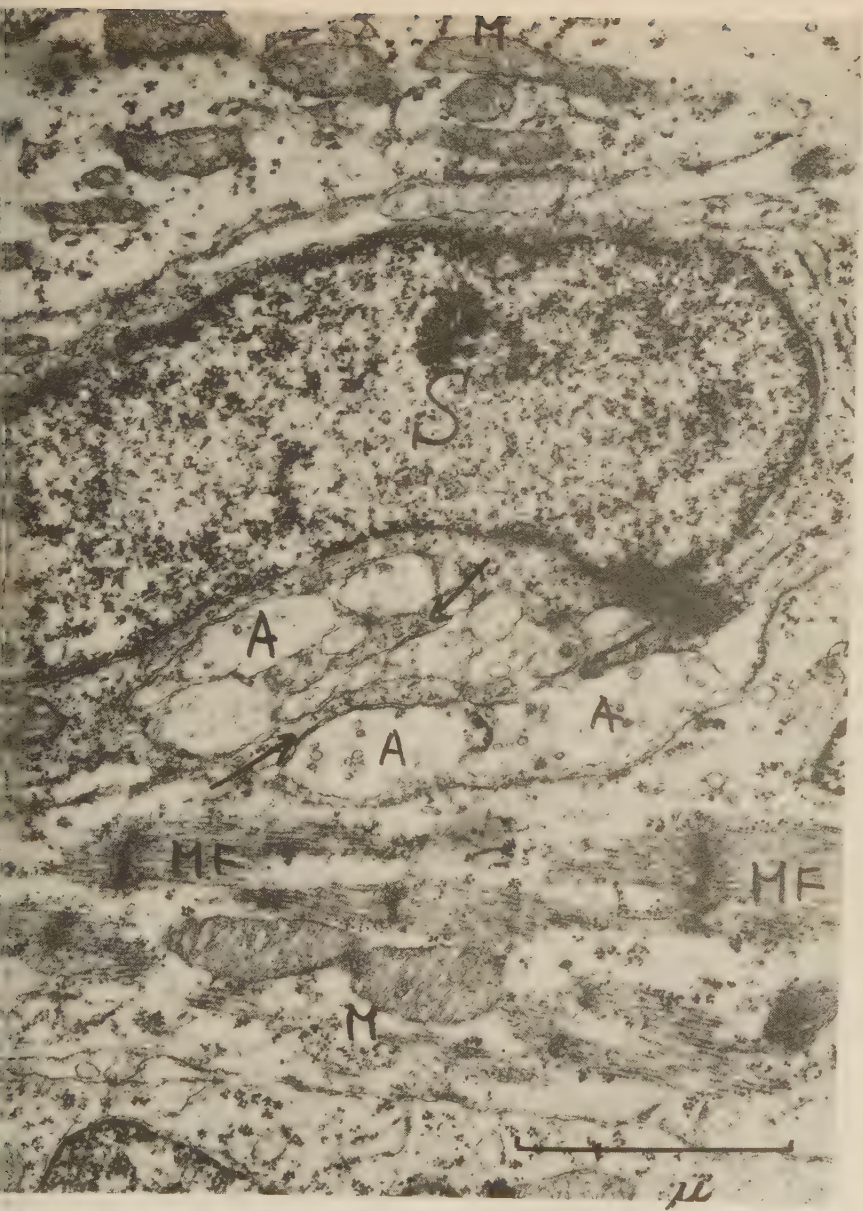
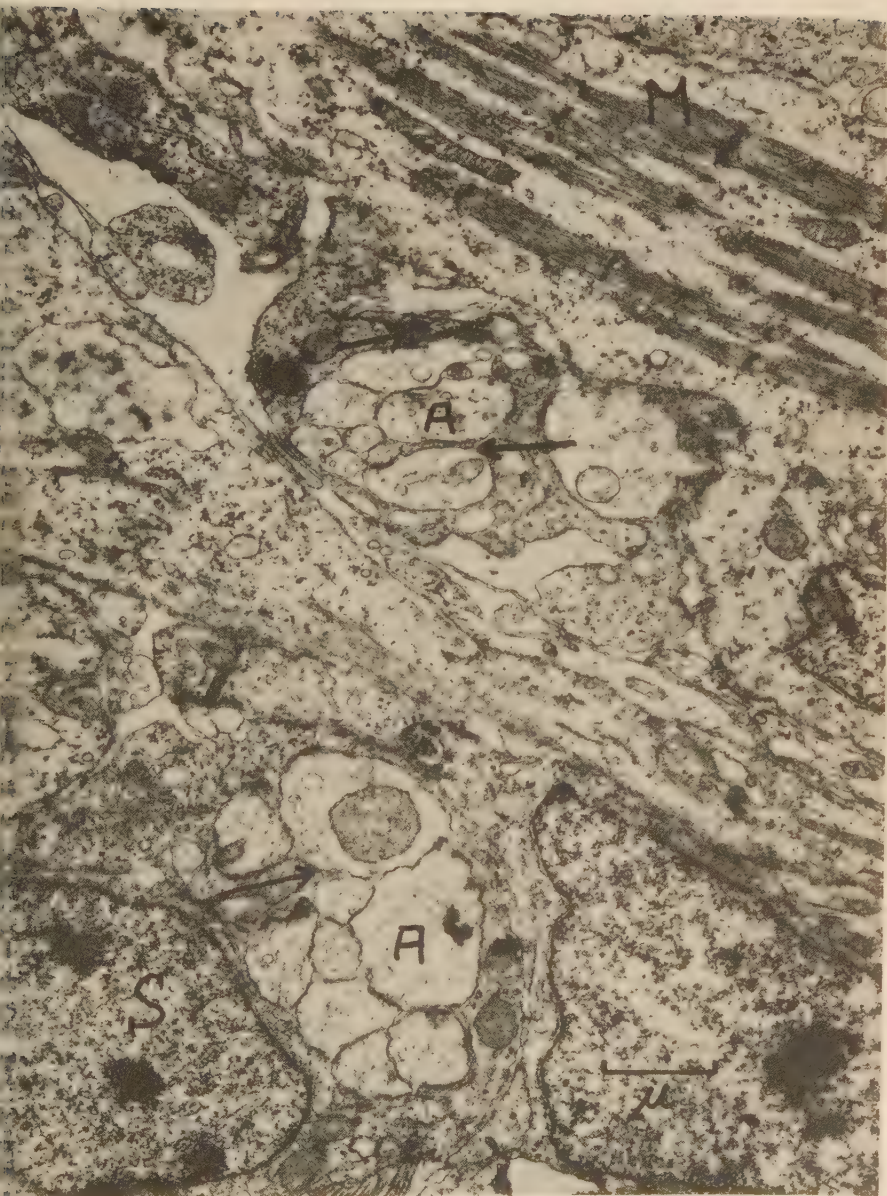


Abb. 19) wie 18.

Axonbündel (A) an der Peripherie eines Muskelfaserbündels (M), beginnende Abgrenzung der Axone durch Schwannzellfortsätze ($\downarrow$), Schwannzelle (S).

Vergrößerung 1 : 21 000



Herrn Prof. Dr. med. H. J. Merker danke ich für die
Überlassung des Themas

"Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die
Entwicklung der quergestreiften Muskulatur im Ge-
sichtsbereich von Rattenembryonen",

sowie für die freundliche Unterstützung, die er mir
bei der Durchführung dieser Arbeit jederzeit gewähr-
te.

LEBENS LAUF

Am 9.3.1938 wurde ich als Tochter des Apothekers Max Boysen und seiner Frau Gertrud, geb. Obst, in Berlin geboren.

In Falkensee besuchte ich die 5. Grundschule und anschließend die Heinrich-von-Kleist-Schule in Berlin, an der ich 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1959 immatrikulierte ich mich an der Philosophischen Fakultät der Freien Universität Berlin, um Germanistik und Romanistik zu studieren. Mit dem Studium der Zahnmedizin begann ich im Sommersemester 1962 an der Freien Universität Berlin.

Das Physikum bestand ich im Sommer 1964 und legte am 21.7.1967 das Staatsexamen mit der Note "gut" ab. Am 2.8.1967 erhielt ich die Approbationsurkunde.

Seit dem 1.9.1967 bin ich als zahnärztliche Assistentin tätig.

